

明 細 書

タンパク質巻き戻し材料

技術分野

[0001] 本発明は、不活性タンパク質の機能賦活方法に関するものであり、更に詳しくは、高次構造が未形成なために不活性なタンパク質、あるいはある種の原因で立体構造が変化し、失活したタンパク質をリフォールディングさせ、該タンパク質固有の本来機能を賦活・再生させることを可能とする不活性タンパク質の機能賦活方法、及び該方法を利用した活性タンパク質の製造方法に関するものである。また、本発明は、不活性タンパク質の機能賦活操作・工程に使用される試薬・物質・材料に関するものであり、更に詳しくは、高次構造が未形成なために、不活性なタンパク質、あるいは、ある種の原因で立体構造が変化し、失活したタンパク質をリフォールディングさせ、該タンパク質固有の、本来機能を賦活・再生させる操作・工程において用いられる試薬・物質・材料、いわゆる試剤キット、及び該キットを利用した不活性タンパク質の活性化に関するものである。更に、本発明は、不活性タンパク質の機能賦活剤(リフォールディング剤)及び成形体に関するものであり、更に詳しくは、高次構造が未形成なために不活性なタンパク質、あるいはある種の原因で立体構造が変化し、失活したタンパク質をリフォールディングさせ、該タンパク質固有の本来機能を賦活・再生させる能力を有するチップ等のある種のデバイス、及びそれらを利用した不活性タンパク質の活性化、すなわち活性タンパク質の製造・生産に関するものである。

背景技術

[0002] 生体内で实际的に作用し、働くのは遺伝子ではなく、それらから作られるタンパク質である。したがって、タンパク質の機能・構造の解明・解析は、例えば、病気の治療や創薬に直結し、極めて重要である。このため、種々のタンパク質を様々な方法で合成・生産し、それらの構造を調べ、生体内における作用機構と役割を解明することが活発に行われている。そして、今や、タンパク質の機能は、それらを構成するアミノ酸の配列・鎖長のみならず、それらの取る秩序だった立体構造(高次構造)によって決まることは周知のこととなっている。

- [0003] タンパク質の合成は、一般には、大腸菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の発現系を用いて行われる。昆虫細胞や哺乳動物細胞による合成では、得られるタンパク質は、高次構造が制御され、秩序だった立体構造を取り、可溶性である場合が多い。しかし、これらの方法は、分離精製の操作が非常に煩雑であり、目的のタンパク質を得るまでに時間がかかり、コスト高となるばかりか、得られるタンパク質の量も極めて少ないという欠点がある。これに対して、大腸菌によるタンパク質合成は、操作が簡単で、目的タンパク質を得るのにさして時間を要せず、コストもさほどかからない。このため、現在は、目的タンパク質の合成を担う遺伝子コードを組み込ませた大腸菌を用いる方法が、タンパク質合成の主流となっており、生産プロセスも確立されつつある。
- [0004] ところが、ヒトなど高等生物のタンパク質を大腸菌発現系で合成した場合、アミノ酸の結合順序や数、すなわちアミノ酸鎖長に関しては、設計どおりのタンパク質が得られるものの、その立体構造には秩序が無く、高次構造が制御されていないタンパク質、すなわちアミノ酸鎖が纏れ絡まった、いわゆるインクルージョンボディと呼ばれる不溶性タンパク質が得られる。当然のことながら、この不溶性タンパク質のインクルージョンボディは、欲する機能・性能を持たず、活性を示さない。このため、大腸菌による生産プロセスでは、インクルージョンボディを解きほぐし、高次構造を整え、秩序だった立体構造を持つ可溶性タンパク質に変換する操作、すなわちインクルージョンボディのリフォールディング(巻き戻し)が必要である。
- [0005] この種のリフォールディングは、大腸菌による生産タンパク質のみならず、熱履歴等の、ある種の原因で失活したタンパク質の再生にも応用でき、極めて重要な技術である。したがって、従来から、このリフォールディングは盛んに研究され、種々の方法が提案されているが、それらのほとんどはリフォールディング率が低いうえに、ある限定されたタンパク質(特に、分子量の低い特定タンパク質)に対して偶発的に好ましい結果が得られたに過ぎないことが多く、現在、このリフォールディングは、種々のタンパク質に適用可能な一般性、普遍性のある、しかもリフォールディング率の高い効率的で経済的な方法とはなっていない。
- [0006] 最も古くから良く用いられているリフォールディング操作は、透析や希釈である。前者は、タンパク質を界面活性剤や変性剤を含む水溶液に溶かし、これを界面活性剤

や変性剤を含まない緩衝液で透析することで、界面活性剤や変性剤の濃度を下げ、タンパク質をリフォールディングするもの(典型例:Hampton Research社製 FoldIt キット)である。一方、後者は、タンパク質を界面活性剤や変性剤を含む水溶液に溶かした後に、これを単に希釈して行くことで界面活性剤や変性剤の濃度を下げ、リフォールディングさせる(典型例:Hampton Research社製 FoldIt キット)ものである。これらが一般であるが、その他にも、界面活性剤のSodium N-lauroyl sarcosinate溶液にグルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質を溶かし、それを1〜2%のTriton X-100で希釈し巻き戻す(非特許文献1参照)方法など、希釈剤を用いてリフォールディングさせる方法もある。

- [0007] 透析と希釈の両方に対し、Hampton Research社から使い捨てキットが市販されており、これらの操作法では、Ligand binding domains from glutamate and kainate receptors、Lysozyme、Carbonic anhydrase Bなどの極限られたタンパク質でリフォールディングが起こることが認められている(非特許文献2参照)に過ぎず、試行錯誤法の域にとどまっていると言っても過言ではない。したがって、たまたま上手くいった方法の場合でも、他のタンパク質に適用するとほとんどうまくいかないのが通例である。
- [0008] リフォールディングに吸着分離カラムを用いることも試されている。尿素・塩酸グアニジンで変性させたタンパク質、チオレドキシンをゲル濾過にかけると、ゲル濾過中にその巻き戻りが起こる(非特許文献3参照)。しかし、この方法では、リフォールディングは必ずしも十分ではなく、他のタンパク質では満足できる結果が得られないのが通常である。構造が壊れたタンパク質の巻き戻しを促進するタンパク質の一種である分子シャペロンGroELを固定したカラムに、8Mの尿素で可溶化したタンパク質を吸着させ、塩化カリウムと尿素をそれぞれ2M含む溶液で溶離すると、溶離タンパク質の巻き戻りが起こる(非特許文献4参照)。しかし、これらは、Cyclophilin Aなど極めて限られたタンパク質で認められているに過ぎない。特に、分子シャペロンを用いる場合は、それがある種の鋳型であるために、その鋳型の形に適合しないものではまったく役に立たないというのが実情である。
- [0009] また、リフォールディング促進に関与すると考えられるタンパク質3種、GroEL、DsbA

(大腸菌のdisulfide oxidoreductase)及びPPI (human proline cis-trans isomerase)を同時に固定した樹脂に、塩酸グアニジンで変性したタンパク質Scorpion toxin Cn5を混ぜると、このタンパク質の巻き戻りが樹脂上で起こる(非特許文献5参照)ことも報告されている。しかしながら、これについては、Scorpion toxin Cn5などの特定タンパク質にしか適用できない欠点に加え、タンパク質3種を固定した樹脂の調製が煩雑でコスト高となるという問題もある。

- [0010] カラム上の固定物質として巻き戻しタンパク質の代わりに金属キレートを用いる場合もある。ニッケルキレートを固定した樹脂に、塩酸グアニジンと尿素を含む水溶液で溶解変性したHis6- タグ融合タンパク質を吸着させ、変性剤を含まない緩衝溶液で洗うと、該融合タンパク質の巻き戻りが起こる(非特許文献6参照)。本法の適用がこのタンパク質に限られることと、樹脂の調製が煩雑でコスト高となることは同じである。
- [0011] 人工シャペロンとして、 β -シクロデキストリンやシクロアミロースを用い、このシャペロン溶液に界面活性剤で変性したタンパク質を混ぜると、界面活性剤の人工シャペロンによる取り込み除去が生じ、この過程でタンパク質が巻き戻るとの報告(非特許文献7〜9参照)もある。しかし、この方法は、carbonic anhydrase Bなどで成功しているに過ぎない。しかも、繰り返し行える方法ではなく、高コストである。
- [0012] 一方、本発明者らは、これまで、ZSMゼオライトやゼオライトベータ(例えば、非特許文献10、11、特許文献1、2参照)などのゼオライトへのバイオポリマーの吸着現象(非特許文献12参照)について、研究を続けてきた。
- [0013] 特許文献1:特開平6-127937号公報
特許文献2:特開平8-319112号公報
非特許文献1:Anal. Biochem. Vol. 210 (1993) 179-187
非特許文献2:Protein Sci. Vol. 8 (1999):1475-1483
非特許文献3:Biochemistry, Vol. 26 (1987) 3135-3141
非特許文献4:Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94 (1997) 3576-3578
非特許文献5:Nat. Biotechnol. Vol. 17 (1999) 187-191
非特許文献6:Life Science News (Japan Ed.) Vol. 3 (2001) 6-7
非特許文献7:J. Am. Chem. Soc. Vol. 117 (1995) 2373-2374

非特許文献8:J. Biol. Chem. Vol. 271 (1996) 3478-3487

非特許文献9:FEBS Lett. Vol. 486 (2000) 131-135

非特許文献10:Zeolites, Vol. 11 (1991) 842-845

非特許文献11:Adv. Mater., Vol. 8 (1996) 517-520

非特許文献12:Chem. Eur. J., Vol. 7(2001) 1555-1560

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0014] このように、従来、種々のリフォールディングの方法が報告されているが、これらの方法には、上記のような問題があるのが実情であり、そのために、当技術分野においては、鎖長の長短を問わず種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用可能な、一般性、普遍性の高い、しかも繰り返し使用可能な低コストの高効率リフォールディング法を開発することが急務の課題となっていた。また、従来、種々のリフォールディングの方法や、リフォールディング機能を有する物質・材料が報告され、更には、それらから構成されるリフォールディングキットが市販されているが、これらの方法・物質材料並びにキットには、上記のような問題があるのが実情であり、そのために、当技術分野においては、鎖長の長短を問わず、種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用可能な、一般性、普遍性の高い、しかも、繰り返し使用可能な低コストの高効率のリフォールディング物質材料並びに方法、すなわち、経済的で高性能なリフォールディング技術、並びにそれを基とするリフォールディングキットを開発することが急務の課題となっていた。また、今までに、種々のリフォールディングの方法やリフォールディング機能を有する物質・材料が報告されているが、これらの方法・物質材料には、普遍性が無く操作が煩雑で高コストなど、上述のような種々の問題があるのが実情である。そのため、当技術分野においては、第一には、鎖長の長短を問わず種々の高次構造未形成及び変性・失活タンパク質に適用可能な、一般性、普遍性の高い、しかも繰り返し使用可能で、低コスト・高効率のリフォールディング物質・材料並びに方法を開発することが急務の課題となっていた。更に、第二には、従来のリフォールディングの操作・工程においては、遠心分離器及びクロマトグラフィーを用いることが必須であり、これらの度重なる使用が操作・工程を複雑か

つ煩雑で、極めて手間がかかり、高コストにしているという大きな問題もあった。

[0015] このような状況下にあつて、本発明者らは、上記従来技術に鑑みて、上述の課題を解決することが可能な新しいリフォールディング技術を開発することを目標として鋭意研究開発を進めると共に、DNA、RNA、タンパク質等バイオポリマーのゼオライト等金属酸化物上への吸着状況を詳細に調べ(Chem. Eur. J. Vol. 7 (2001) 1555-1560)、タンパク質の分離精製方法を鋭意研究している過程で、大腸菌等の発現系で生産した高次構造未形成タンパク質、あるいは熱履歴等のある種の原因で失活したタンパク質をゼオライトベータで処理すると、それらのタンパク質が本来の機能・活性を示すようになること、そして、この方法は、本発明を、分子量10万を越える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォールディングに適用できる、一般性、普遍性の高い方法として使用し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。更に、本発明者らは、BEA構造のゼオライト、すなわち、ゼオライトベータが変性タンパク質の巻き戻し機能を有することを見出し、ゼオライトベータからなるリフォールディング剤を開発すると同時に、それを必須構成成分とするタンパク質リフォールディングキットを開発するに至った。更に、該リフォールディング剤が、大腸菌等の発現系で生産した高次構造未形成タンパク質あるいは熱履歴等の、ある種の原因で失活したタンパク質等、分子量10万を越える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質等の巻き戻しにも適用できることを認め、本発明、すなわち、一般性、普遍性の高いタンパク質のリフォールディング技術並びにリフォールディングキットを完成するに至った。本発明の第1の態様は、タンパク質の機能賦活化方法を提供することを目的とするものである。また、本発明の第2の態様は、新規リフォールディングキットを提供することを目的とするものである。また、本発明の第3の態様は、新規タンパク質巻き戻し材料を提供することを目的とするものである。更に、本発明の第4の態様は、BEA構造のゼオライトを含む成形体で構成されたリフォールディング成形体を提供すること、また、不活性なタンパク質をリフォールディングさせ、該タンパク質固有の本来機能を賦活・再生させる能力を有するリフォールディング成形体を提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0016] 次に、本発明の第1の態様について更に詳細に説明する。

本発明の第1の態様は、以下の技術的手段から構成される。

(1) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質の機能を賦活する方法であって、該タンパク質をゼオライトベータに接触させることにより、該タンパク質固有の本来機能を発現させ得る状態にすることを特徴とするタンパク質の機能賦活方法。

(2) 該タンパク質を、タンパク質変性剤、界面活性剤及び／又はリフォールディングバッファの存在下で、ゼオライトベータと接触させる、前記(1)に記載の方法。

(3) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、大腸菌の発現系で産生されたタンパク質である、前記(1)に記載の方法。

(4) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、熱履歴の原因で失活したタンパク質である、前記(1)に記載の方法。

(5) ゼオライトベータを含む溶液との混合、又はゼオライトベータ充填カラムへの注入により、タンパク質をゼオライトベータに吸着させ、次いで脱着させる、前記(1)に記載の方法。

(6) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォールディングすることを特徴とするタンパク質の主体構造の改変方法。

(7) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォールディングすることにより、高次構造が制御されて該タンパク質固有の本来機能が賦活されたタンパク質を製造することを特徴とする活性タンパク質の製造方法。

(8) 目的のタンパク質の合成を担う遺伝子コードを組み込んだ大腸菌により産生された不活性タンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォールディングする、前記(7)に記載のタンパク質の製造方法。

[0017] 本発明では、機能賦活の対象となるタンパク質としては、一般には、大腸菌等の発現系で得られる立体構造が無秩序なタンパク質、いわゆるインクルージョンボディ、あるいは熱履歴等のある種の原因で失活したタンパク質が用いられる。本発明では、これらのタンパク質をゼオライトベータで処理して該タンパク質の立体構造をリフォール

ディングすることにより、該タンパク質固有の本来機能の賦活を行う。賦活操作は、通常、該タンパク質を変性剤や界面活性剤などを含む溶液に先ず分散溶解し、その後、ゼオライトベータを含む溶液との混合や、ゼオライトベータ充填カラムへの注入により、該タンパク質をゼオライトベータに吸着させ、次いで、ゼオライトベータから該タンパク質を脱着させる手順で行われる。本発明で機能賦活剤として用いられるゼオライトベータとしては、未焼成ゼオライトベータ、及び例えば、合成ゼオライトベータを300〜500℃で3〜10h焼成した焼成ゼオライトベータが例示されるが、これらに制限されるものではなく、これらと同等のものであれば同様に使用することができる。

[0018] ゼオライトベータに吸着前のタンパク質の分散溶媒としては、一般には、それが大腸菌等の発現系で生産されること、及びタンパク質は、通常、水溶液中で使われることが多く、失活した場合でも水溶液中にあることが多いことから、好適には、例えば、水が用いられる。しかし、必ずしもこれに限定されるものではなく、該タンパク質と反応を起こさないもの、及び該タンパク質の立体構造を不本意な形に変えるものでなければ、基本的には問題はなく、このような場合は、それらの溶媒単独あるいは水と混合して用いることが可能である。この種の溶媒の典型例として、一価及び多価のアルコールをあげることができるが、これらに限定されるものではない。

[0019] 該タンパク質の吸脱着は、一般には、インクルージョンボディなど、纏れ絡んだタンパク質鎖長を解きほぐし易くし、また、巻き戻り易くするために、変性剤や界面活性剤、pH調整剤、リフォールディング因子等の存在下、及び／又はタンパク質鎖長中に不本意に生成したS-S結合を切断するために、ある種の還元剤の存在下、で行われる。この種の変性剤や界面活性剤、pH調整剤、リフォールディング因子の典型例として、例えば、塩酸グアニジン、トリアミノメタン塩酸塩、ポリエチレングリコール、シクロデキストリン、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、ポリリン酸、スクロース、グルコース、グリセロール、イノシトール、Dextran T-500 やFicoll1400などを挙げることができるが、これらにとどまるものではなく、同様な作用を持つものはいずれも使用可能である。

[0020] 不本意に生成したS-S結合を切断し、本来の構造に戻す還元剤としては、安価で入手し易いことから、通常は2-メルカプトエタノールが用いられるが、これに限定され

るものではなく、同様な作用を有するものは全て使用可能である。当然のことながら、タンパク質鎖長が解きほぐれやすい場合や、不本意にS-S結合が生成しない場合は、変性剤や界面活性剤、及び／又は防止剤を必ずしも使う必要がないので、これらの存在は常に必須とは限らず、状況に応じ適宜選択して用いられる。また、それらを用いる場合も、それらの量は状況に応じ適宜決められることになる。

[0021] また、該タンパク質の脱着には、一般には、置換吸着が用いられるが、基本的には該タンパク質の脱着後の機能賦活を阻まない操作であれば、いかなる操作も適用可能であり、特に限定されるものではない。したがって、pH変化、温度変化なども用いることができる上に、これらと置換吸着を併用することもできる。置換吸着で該タンパク質の脱着を促す物質には、一般的には、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)などの界面活性剤やハロゲン化アルカリなどの塩が用いられるが、これらに限定されるものではなく、該タンパク質の脱着後の機能賦活を阻まないものであれば、通常、カラムクロマトグラフィーでの溶離に用いられるものなど、種々のものが使用可能である。

[0022] 更に言えば、該タンパク質の該ケイ酸塩への吸着、あるいはそれからの脱着を促すために、上記操作と併用して、種々の付加的操作を行うこともできる。このような操作の典型例には、例えば、超音波やマイクロ波の照射や、磁場や電場の印加等がある。以上述べてきた本発明の手順・操作により、大腸菌等の発現系を用いて生産した高次構造未形成タンパク質、並びにある種の原因で失活したタンパク質に、リフォールディングが起き、それらのタンパク質が持つ本来の機能が速やかに賦活される。本発明の機能賦活剤のゼオライトベータは、熱的、化学的に極めて安定であり、しかも安価であるうえ、繰り返し使用が可能であるので、本発明は、例えば、生化学品製造、医薬品製造にとってきわめて有用であり、その経済的効果は計り知れないものがある。

[0023] 次に、本発明の第2の態様について更に詳細に説明する。

本発明の第2の態様は、以下の技術的手段から構成される。

(1) 高次構造が無秩序なため、不活性であるタンパク質の高次構造を整え、活性にする、タンパク質の機能賦活(リフォールディング)操作・工程で用いる試剤キットであって、BEA構造のゼオライト(ゼオライトベータ)からなるリフォールディング剤を構成

要件として含むことを特徴とするタンパク質リフォールディングキット。

(2) キットが、上記ゼオライトベータからなるリフォールディング剤、タンパク質変性剤及びpH調整剤を基本構成成分とし、更に、タンパク質S-S架橋形成防止剤、界面活性剤及びリフォールディング因子のうちの1種又は2種以上を含む組み合わせから構成されることを特徴とする前記(1)記載のリフォールディングキット。

(3) ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素、酸素及びそれ以外の1種又は2種以上の元素を含むことを特徴とする前記(1)又は(2)に記載のリフォールディングキット。

(4) ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素と酸素、又はケイ素とアルミニウムと酸素のみからなることを特徴とする前記(1)から(3)のいずれかに記載のリフォールディングキット。

(5) ゼオライトベータが、アンモニウム類を含むことを特徴とする前記(1)から(4)のいずれかに記載のリフォールディングキット。

(6) アンモニウム類が、アンモニウムイオン、有機アミン及び／又は酸アミドであることを特徴とする前記(5)に記載のリフォールディングキット。

(7) 有機アミンが、テトラアルキルアンモニウムであることを特徴とする前記(6)に記載のリフォールディングキット。

(8) キット中のタンパク質変性剤が、塩酸グアニジンであることを特徴とする前記(2)から(7)のいずれかに記載のリフォールディングキット。

(9) キット中のpH調整剤が、トリアミノメタン三塩酸塩(TrisHCl)及び／又は4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸(HEPES)であることを特徴とする前記(2)から(8)のいずれかに記載のリフォールディングキット。

(10) キット中のタンパク質S-S架橋形成防止剤が、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、シスチン又はチオフェノールであることを特徴とする前記(2)から(9)のいずれかに記載のリフォールディングキット。

(11) キット中の、界面活性剤及びリフォールディング因子が、ポリエチレングリコール、Ficol170、Ficol1400、ポリリン酸、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、スクロース、グルコース、グリセロール、イノシトール、シクロデキストリン、アミロース、Dextran T-500、Tween20、Tween40、Tween60、NP-40、SB3-14、SB12、CTAB及びTritonX-100のう

ちの1種又は2種以上から選ばれることを特徴とする前記(2)から(10)のいずれかに記載のリフォールディングキット。

(12)キットが、HEPES、ハロゲン化アルカリ、2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子及び界面活性剤から構成される溶液(リフォールディングバッファー)、上記リフォールディング剤、塩酸グアニジン、TrisHCl及び2-メルカプトエタノールからなるキットであるか、又は、該リフォールディングバッファー、該リフォールディング剤、塩酸グアニジン、TrisHCl、2-メルカプトエタノール及びハロゲン化アルカリからなるキットであることを特徴とする前記(1)から(7)のいずれかに記載のリフォールディングキット。

[0024] 本発明の不活性タンパク質の機能賦活を行う試剤群、すなわち、リフォールディングキットの対象となるタンパク質は、高次構造が整っていない不活性なタンパク質全てであるが、一般には、大腸菌等の発現系で得られる立体構造が無秩序なタンパク質、いわゆるインクルージョンボディ、あるいは熱履歴等の、ある種の原因で失活したタンパク質である。本発明のキットは、該タンパク質の、該キット中のゼオライトベータからなるリフォールディング剤への吸着・脱離過程で、該タンパク質の立体構造をリフォールディングし、該タンパク質本来の機能の賦活・付与を行うが、該リフォールディング剤の本能力は、必ずしもそれに限定されるものではなく、通常、次のような操作で発揮される。換言すれば、次のような操作で不活性タンパク質の機能賦活が行われる。すなわち、この操作は、まず、該タンパク質を、変性剤や界面活性剤等を含む溶液に分散溶解し、この後、該リフォールディング剤を含む溶液との混合や、該リフォールディング剤充填カラムへの注入により、該タンパク質を該リフォールディング剤に吸着させ、次いで、該リフォールディング剤から該タンパク質を脱着させる手順で行われる。

[0025] 本発明のキットは、ゼオライトベータからなるリフォールディング剤の他、好適には、例えば、変性剤やpH調整剤を含み、更には、これらの他に、リフォールディング剤からのタンパク質の脱着促進と、リフォールディング後の再インクルージョンボディ化を防ぐためのリフォールディング因子及び／又は界面活性剤、S-S架橋形成防止(阻害)剤から、構成されている。

- [0026] 本発明のキット中の、この種の変性剤やpH調整剤の典型例としては、例えば、それぞれ、塩酸グアニジンや、トリスアミノメタン塩酸塩 (TrisHCl) 及び4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸 (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid : HEPES) 等を挙げることができるが、これらに留まるものではなく、同様な作用を持つものはいずれも使用可能である。
- [0027] また、本発明のキット中の、リフォールディング因子や界面活性剤の典型例としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG20K、PEG800、PEG200、PEG3350)、Ficol170、Ficol1400、ポリリン酸、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、スクロース、グルコース、グリセロール、イノシトール、シクロデキストリン、アミロース、Dextran T-500、Tween20、Tween40、Tween60、NP-40、SB3-14、SB12、CTAB及びTritonX-100等を挙げることができるが、これらに限定されるものではなく、同様な作用を持つものはいずれも使用可能である。
- [0028] 当然のことながら、タンパク質鎖長が解きほぐれやすい場合や、不本意にS-S架橋が生成しない場合は、変性剤や界面活性剤、及び／又は防止剤を必ずしも使う必要がないので、これらの存在は常に必須とは限らず、状況に応じ適宜選択してキットとして用いられる。また、キットを構成する成分の量は、それを用いるときの状況に応じ適宜決められることになるが、本発明のキットは、通常は、ゼオライトベータからなるリフォールディング剤、塩酸グアニジン (変性剤) 及びTrisHClとHEPES (pH調整剤) を有し、更に、2-メルカプトエタノールと前記リフォールディング因子や界面活性剤の1種あるいは2種以上より構成されのが好ましい。
- [0029] 一般に、本キットを用いてのリフォールディング操作・工程中のタンパク質の脱着過程では、通常、該キット中の試剤 (リフォールディング因子や界面活性剤) による置換吸着が用いられるが、基本的には、該タンパク質の脱着後の機能賦活を阻まない操作であればいかなる操作も適用可能であり、特に限定されるものではない。したがって、pH変化、温度変化等も用いることができる上に、これらと置換吸着を併用することもできる。
- [0030] ところで、置換吸着の際、該タンパク質の脱着を促す物質として、従来から、カラム

クロマトグラフィーの溶離では、ハロゲン化アルカリ等の塩が頻繁に用いられており、これらの併用で顕著な効果が得られる場合も多い。また、本発明のキット構成試剤を用いる時に、キット構成試剤間の反応等、特に問題や支障が起きない場合は、キット構成試剤の幾つかをあらかじめ合わせておき、一つの試剤としておくこともできる。例を挙げれば、HEPES、ハロゲン化アルカリ(例えば、塩化ナトリウム)、2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子(例えば、ポリエチレングリコールのPEG20K、PEG800、PEG200、PEG3350のうちの1種や、Ficol170あるいは β -シクロデキストリン)及び界面活性剤(例えば、Tween20、Tween40、Tween60、NP-40あるいはTritonX-100)からなる溶液をリフォールディングバッファーとして一纏めにし、本発明のキットの構成試剤の一つにすることも可能である。これは、リフォールディング操作・工程でしばしば大きな利便となる。

[0031] 更に言えば、該タンパク質の該キット中のリフォールディング剤への吸着、あるいはそれからの脱着を促すために、上記操作と併用して種々の付加的操作を行うこともできる。このような操作の典型例には、例えば、超音波やマイクロ波の照射や、磁場や電場の印加がある。以上述べてきた、本発明のキットを用いての手順・操作により、該リフォールディング剤の持つタンパク質巻き戻し能が高度に発揮されることになり、大腸菌等の発現系を用いて生産した高次構造未形成タンパク質、並びに、ある種の原因で失活したタンパク質にリフォールディングが起き、それらのタンパク質が本来持つはずの機能が速やかに賦活される。

[0032] 以上述べてきた、不活性タンパク質の活性賦活機能・変性タンパク質の巻き戻し能を発揮するリフォールディング剤を構成するBEA構造のゼオライト、いわゆるゼオライトベータとしては、典型例として、例えば、通常の市販ゼオライトベータ(例えば、商品名HSZ-930NHA、東ソー社製)、文献等に従い自前で合成・調製したゼオライトベータ(Zeolites, Vol. 11 (1991) 202.参照)、それらを、焼成して得られるゼオライトベータ、該ゼオライトの有する空間中に、アンモニウムや種々の脂肪族及び／又は芳香族アンモニウム等のアンモニウム類があるゼオライトベータ、該ゼオライトを形成する骨格ケイ素の一部が他の金属に変わった骨格置換ゼオライトベータ、前記アンモニウム含有骨格置換ゼオライトベータ等が挙げられるが、ゼオライトベータの骨格構造

を持つものであれば、基本的には、全て該機能・能力を有しており、該リフォールディング剤を構成するゼオライトベータは、ここに挙げたものに必ずしも限定されるものではない。

[0033] ところで、該リフォールディング剤の該機能・能力は、不活性並びに変性タンパク質の該リフォールディング剤への接触、すなわち、吸着・脱離で発揮され、この際には、リフォールディング剤表面と対象タンパク質との間の親和性が重要となる上に、また、該タンパク質の吸着・脱離は、その分散溶媒、分散溶媒中の変性剤や界面活性剤並びにリフォールディング因子、更には、分散溶媒のpH等で影響される場合も多いので、対象とするタンパク質及びそれを含む溶液の成分状況等に応じて、該リフォールディング剤のリフォールディング能は、該リフォールディング剤を構成する前述の種々のゼオライトベータで、しばしば異なる。しかしながら、総じて、アンモニウム類を含むゼオライトベータより構成されるリフォールディング剤は、それを含まないものより高いリフォールディング能を示すので、該リフォールディング剤としては、アンモニウム類を含むゼオライトベータ及びアンモニウム類を含む骨格置換ゼオライトベータからなるリフォールディング剤を用いる方が好ましいことがしばしばである。

[0034] 該リフォールディング剤を構成するゼオライトベータに含有されるべきアンモニウム類としては、該ゼオライトの有する空間中に留まり易いアンモニウム類、例えば、アンモニウムイオン、アルキル基がメチル、エチル、プロピル及びブチル等のモノ、ジ、トリ及びテトラアルキルアンモニウムイオン、更には、5員環、6員環及び7員環の脂肪族アミン及び芳香族アミンのアンモニウムイオン、より詳しくは、ピペリジウムイオン、アルキルピペリジウムイオン、ピリジニウムイオン、アルキルピリジニウムイオン、アニリンイオン、N-アルキルアニリンイオン等を挙げることができ、また、酸アミドとしての、例えば、ホルムアミド、アセトアミド及びこれらのN-アルキル置換体を挙げることができるが、基本的には、ゼオライトベータの有する細孔中に入ることが可能なアンモニウム類であればいずれでもよく、ここに例示したアンモニウム類に限定されるものではない。

[0035] 該リフォールディング剤を構成するゼオライトベータの骨格を形成する元素は、一般にはケイ素と酸素、あるいはケイ素とアルミニウムと酸素であるが、ケイ素やアルミニウムの一部が他の元素に置換したゼオライトベータ、及びその細孔中に前記アンモ

ニウム類を含む置換ゼオライトベータも、不活性タンパク質の活性賦活機能を行うリフォールディング剤となり得る。該ゼオライトベータの骨格ケイ素と置換可能なものの典型としては、例えば、アルミニウム、ホウ素、燐、ガリウム、錫、チタン、鉄、コバルト、銅、ニッケル、亜鉛、クロム、バナジウム等を挙げることができるが、これらに留まるものではなく、基本的にゼオライトベータの構造を破壊しないものであればいずれでも良い。また、その置換量に関しても、ゼオライトベータの構造を破壊しない量であれば、置換量はいかなる量でもかまわず、該置換ゼオライトベータは、不活性並びに変性タンパク質のリフォールディング剤となり得ることは同様である。本発明のその他の構成については、本発明の第1の態様に記載した事項が、本発明にも同様に適用される。

[0036] 次に、本発明の第3の態様について更に詳細に説明する。

本発明の第3の態様は、以下の技術的手段から構成される。

- (1) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質の、高次構造を整え、活性にするタンパク質巻き戻し機能を有するリフォールディング剤であって、BEA構造のゼオライト(ゼオライトベータ)からなることを特徴とするタンパク質リフォールディング剤。
- (2) タンパク質変性剤、界面活性剤及び／又はリフォールディングバッファの存在下で、タンパク質の巻き戻しが行われる、前記(1)に記載のリフォールディング剤。
- (3) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、大腸菌の発現系で生産されたタンパク質であることを特徴とする、前記(1)に記載のリフォールディング剤。
- (4) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、熱履歴の原因で失活したタンパク質であることを特徴とする、前記(1)に記載のリフォールディング剤。
- (5) ゼオライトベータが、アンモニウムイオン、有機アンモニウムイオン及び／又は尿素を含むことを特徴とする、前記(1)に記載のリフォールディング剤。
- (6) 有機アンモニウムイオンが、モノ、ジ、トリ及び／又はテトラアルキルアンモニウムイオン(アルキル基は、メチル、エチル、プロピル又はブチル)であることを特徴とする、前記(5)に記載のリフォールディング剤。
- (7) ゼオライトベータの骨格構造が、酸素とそれ以外の1種又は2種以上の元素からなることを特徴とする、前記(1)に記載のリフォールディング剤。
- (8) ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素及び酸素、又はケイ素、アルミニウム及び

酸素からなることを特徴とする、前記(7)に記載のリフォールディング剤。

(9) 溶液中に分散したタンパク質と接触することにより、タンパク質巻き戻し機能を発揮する、前記(1)から(8)のいずれかに記載のリフォールディング剤。

(10) 溶液中の前記タンパク質を、該リフォールディング剤との混合、又は該リフォールディング剤充填カラムへの注入により、吸着させ、しかる後、脱着させる操作で該タンパク質の巻き戻しを起こさせる、前記(1)から(9)のいずれかに記載のリフォールディング剤。

[0037] 本発明の、ゼオライトベータからなるリフォールディング剤の対象となるタンパク質は、高次構造が整っていない不活性なタンパク質全てであるが、特に、大腸菌等の発現系で得られる立体構造が無秩序なタンパク質、いわゆるインクルージョンボディ、あるいは熱履歴等のある種の原因で失活したタンパク質である。本発明のリフォールディング剤は、該タンパク質の該リフォールディング剤への吸着・脱離過程で、該タンパク質の立体構造をリフォールディングし、該タンパク質本来の機能の賦活・付与を行うが、該リフォールディング剤の本能力は、必ずしもそれに限定されるものではなく、通常、次のような操作で発揮される。換言すれば、次のような操作で不活性タンパク質の機能賦活が行われる。まず、該タンパク質を、変性剤や界面活性剤などを含む溶液に分散溶解し、この後、本発明のリフォールディング剤を含む溶液との混合や、本リフォールディング剤充填カラムへの注入により、該タンパク質を本リフォールディング剤に吸着させ、次いで、本リフォールディング剤から該タンパク質を脱着させる手順で行われる。

[0038] 該タンパク質の脱着には、一般には、置換吸着が用いられるが、基本的には、該タンパク質の脱着後の機能賦活を阻まない操作であれば、いかなる操作も適用可能であり、特に限定されるものではない。したがって、pH変化、温度変化なども用いることができる上に、これらと置換吸着を併用することもできる。更には、置換吸着の際、該タンパク質の脱着を促す物質として、従来から、カラムクロマトグラフィーの溶離では、ハロゲン化アルカリやドデシル硫酸ナトリウムなどの塩が、頻繁に用いられており、これらの併用で顕著な効果が得られる場合も多い。したがって、置換吸着で該タンパク質の脱着を行う際には、これらカラムクロマトグラフィーの溶離に用いられるものなど、

種々のものの塩と界面活性剤やリフォールディング因子とを併用することも可能であり、この種の併用塩としては、ここに挙げたものに限定されるものではなく、該タンパク質の脱着後の機能賦活を阻まないものであれば、いずれも使用可能である。

[0039] 更に言えば、該タンパク質の、本発明リフォールディング剤への吸着、あるいはそれからの脱着を促すために、上記操作と併用して、種々の付加的操作を行うこともできる。このような操作の典型例には、例えば、超音波やマイクロ波の照射や、磁場や電場の印加がある。以上述べてきた手順・操作により、該リフォールディング剤の持つタンパク質巻き戻し能が高度に発揮されることになり、大腸菌等の発現系を用いて生産した高次構造未形成タンパク質並びにある種の原因で失活したタンパク質に、リフォールディングが起き、それらのタンパク質が本来持つはずの機能が速やかに賦活される。本発明のその他の構成については、本発明の第1の態様に記載した事項が、本発明にも同様に適用される。

[0040] 次に、本発明の第4の態様について更に詳細に説明する。

本発明の第4の態様は、以下の技術的手段から構成される。

(1) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質の高次構造を整え活性にする、いわゆる巻き戻し機能を有するBEA構造のゼオライト(通称、ゼオライトベータ)を含む成形体で構成されることを特徴とするリフォールディング成形体。

(2) 成形体が、ゼオライトベータ、又はゼオライトベータとそれを支持する基材からなることを特徴とする、前記(1)に記載のリフォールディング成形体。

(3) タンパク質と接触することにより、巻き戻し機能を発揮する前記(1)に記載のリフォールディング成形体。

(4) タンパク質変性剤、界面活性剤及び／又はリフォールディングバッファの存在下で、タンパク質の巻き戻しが行われる、前記(1)に記載のリフォールディング成形体。

(5) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、大腸菌の発現系で生産されたタンパク質であることを特徴とする、前記(1)に記載のリフォールディング成形体。

(6) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、熱履歴の原因で失活した

タンパク質であることを特徴とする、前記(1)に記載のリフォールディング成形体。

(7)ゼオライトベータが、アンモニウムイオン及び／又は有機アンモニウムイオンを含むことを特徴とする、前記(1)に記載のリフォールディング成形体。

(8)有機アンモニウムが、モノ、ジ、トリ及び／又はテトラアルキルアンモニウム(アルキル基は、メチル、エチル、プロピル、ブチル)イオンであることを特徴とする、前記(7)に記載のリフォールディング成形体。

(9)ゼオライトベータの骨格構造が、酸素とそれ以外の1種又は2種以上の元素からなることを特徴とする、前記(1)に記載のリフォールディング成形体。

(10)ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素及び酸素、又はケイ素、アルミニウム及び酸素からなることを特徴とする、前記(9)に記載のリフォールディング成形体。

(11)溶液中に分散したタンパク質と接触することによって、タンパク質巻き戻し機能を発揮する、前記(1)から(10)のいずれかに記載のリフォールディング成形体。

(12)溶液中の前記タンパク質を、該リフォールディング成形体と混合、又は該成形体上に流す、又は滴下することにより、該タンパク質を該成形体に吸着させ、しかる後、脱着させる操作で該タンパク質の巻き戻しを起こさせる機能を有する、前記(1)から(11)のいずれかに記載のリフォールディング成形体。

[0041] 本発明のリフォールディング成形体は、BEA構造のゼオライト、いわゆるゼオライトベータ単味、又はゼオライトベータとそれを支持する基材(支持体)とから構成される。前者は、支持体無しで、後者は、支持体付きである。一般的に言って、ゼオライトという物質は、自己焼結性が乏しいため、単味単独では成形しにくいことが多いので、該成形体の作製、すなわち形態・形状の設計・制御に関しては、前者に比べ後者が、予め形が整えられた支持体上にゼオライトベータを固定・被覆することなどが可能なため、一般に、自由度が高く、有利であることが多い。

[0042] しかしながら、該成形体の支持体の有無から始まり、形態・形状の設計・制御法、すなわち作製方法は、該成形体の利用方法や使用形態によって変わるものであり、適宜選定されるものである。したがって、該成形体の作製には、公知の方法が全て利用可能であり、適宜選定され、あるいは組み合わせられて使用されることになるので、特に限定されるものでも無く、また、特に詳しい説明や言及を必要とするものではないが、

該成形体の作製法、すなわち形態・形状の設計・制御法として、強いて二、三例を挙げれば、次のようなものがある。支持体無し、支持体付きの、いずれの該成形体の作製にも、ゼオライト成形体の従来の典型的作製法、すなわちゼオライトのその場合合成法、ドライゲルコンバージョン法、固相変換法など(Stud. Surf. Sci. Catal. Vol. 125 (1999) 1-12、表面、Vol. 37 (1999) 537-557参照)が利用可能であり、更に、支持体付き該成形体の作製では、有機ポリマー中への混入法(Zeolites, Vol. 16 (1996) 70参照)、アルミナ等の無機粉体によるゼオライトベータの接着・成形、水に不溶の接着剤によるゼオライトベータの支持体上への固定化などが利用可能であるが、これらに限られるものではない。

[0043] 該成形体の形態・形状については、チップ状、膜状、ペレット状、ビーズ状など、該成形体の利用方法・使用形態に応じて、適宜選定される。特に、支持体付き該成形体では、ゼオライトベータの固定・被覆を種々の形状、例えば、板、球、円筒、チューブ、カラム、溝、U字路などの支持体上に、前記方法等で行うことができるので、該成形体の形状を如何様にも所望の形にすることができるという利点がある。この場合の支持体については、ガラス、石英、アルミナ、シリカ、コーージェライトやムライトなどの種々のセラミックス、濾紙などのセルロース、テフロン(登録商標)、ナイロン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレート(ペット)など種々の有機ポリマーを挙げることができるが、基本的には、支持体が水に不溶であり、タンパク質に悪影響を及ぼさないものであれば、いずれも良く、ここに挙げたものに限られるものではない。

[0044] 本発明のリフォールディング成形体の対象となるタンパク質は、高次構造が整っていない不活性なタンパク質全てであるが、特に、大腸菌等の発現系で得られる立体構造が無秩序なタンパク質、いわゆるインクルージョンボディ、あるいは熱履歴等の、ある種の原因で失活したタンパク質である。本発明のリフォールディング成形体は、該タンパク質の該リフォールディング成形体への吸着・脱離過程で、該タンパク質の立体構造をリフォールディングし、該タンパク質本来の機能の賦活・付与を行うが、該リフォールディング成形体の本能力は、必ずしもそれに限定されるものではなく、通常、次のような操作で発揮される。換言すれば、次のような操作で不活性タンパク質の機能賦活が行われる。先ず、該タンパク質を、変性剤や界面活性剤などを含む溶

液に分散溶解し、この後、該溶液と本発明のリフォールディング成形体との混合や、該溶液の本リフォールディング成形体上への注入・流入あるいは滴下により、該タンパク質を本リフォールディング成形体に吸着させ、次いで、本リフォールディング成形体から該タンパク質を脱着させる手順で行われ、これらの工程においては、遠心分離器などの分離器を特に必要とはしない。本発明のその他の構成については、本発明の第1の態様に記載した事項が、本発明にも同様に適用される。

発明の効果

[0045] 本発明は、不活性タンパク質の機能賦活方法等に係るものであり、本発明によって、1)大腸菌等の発現系で産生された高次構造が未形成なために不活性なタンパク質、あるいはある種の原因で立体構造が変化して失活したタンパク質の本来の機能・活性をリフォールディングにより賦活させることができる、2)この方法は、インクルージョンボディを効率よくリフォールディングする方法として有用である、3)種々のタンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかもリフォールディング率の高い効率的な方法を提供できる、4)本発明で用いる機能賦活剤のゼオライトベータは、低コストであり、しかも、繰り返し使用可能である、5)この方法は、分子量10万を超える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォールディングに適用できる、6)例えば、大腸菌の発現系によるタンパク質合成プロセスと本発明の方法を組み合わせることで、高次構造の制御されて該タンパク質固有の本来機能がタンパク質を生産する新しい活性タンパク質の製造プロセスを構築することができる、という効果が奏される。

[0046] また、本発明は、不活性タンパク質の機能を賦活する操作・工程に用いる試剤キット、並びにその使用方法に係わるものであり、本発明によって、1)タンパク質の種類を問わず広範な不活性タンパク質に対して、それらの本来の機能を賦活させる万能的試剤群、すなわち、キットを選定できる、2)このキットを用いて、前記タンパク質、例えば、大腸菌等の発現系で産生された高次構造が未形成なために不活性なタンパク質、あるいは、ある種の原因で立体構造が変化して失活したタンパク質を処理することにより、それらのタンパク質の本来の機能・活性をリフォールディングにより賦活させることができる、3)本キットは、インクルージョンボディのタンパク質にも効力を有し

、これを用いるインクルージョンボディの効率的なリフォールディング方法として有用である、4) 本キットを用いることによる不活性タンパク質の機能賦活方法は、タンパク質を構成するアミノ酸の鎖長・配列を問わず種々の変性タンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかも、リフォールディング率の高い効率的な方法として提供される、5) 本キットの必須成分であるリフォールディング剤を構成するBEA構造のゼオライト、すなわち、ゼオライトベータは、低コストであり、しかも、繰り返し使用可能である、6) 本キットを用いる不活性タンパク質の機能賦活方法は、分子量10万を越える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォールディングに適用できる、7) 例えば、大腸菌の発現系によるタンパク質合成プロセスと本キットによる不活性タンパク質の機能賦活とを組み合わせることにより、高次構造が制御されて該タンパク質固有の本来機能が備わったタンパク質を生産する、新規の活性タンパク質製造プロセスを提案・確立することができる、という格別の効果が奏される。

[0047] 更に、本発明は、不活性タンパク質の機能を賦活する能力を有する物質・材料であるリフォールディング剤及び成形体に係わるものであり、本発明によって、1) タンパク質の種類を問わず、広範な不活性タンパク質に対して、それら本来の機能を賦活させる万能的物質・材料、すなわちBEA構造のゼオライト(ゼオライトベータ)からなるリフォールディング剤を選定することができる、2) 本発明のリフォールディング剤に、前記タンパク質、例えば、大腸菌等の発現系で産生された高次構造が未形成なために不活性なタンパク質、あるいはある種の原因で立体構造が変化して失活したタンパク質を接触させることにより、それらタンパク質の本来の機能・活性を、リフォールディングにより賦活させることができる、3) 本発明のリフォールディング剤は、インクルージョンボディのタンパク質にも効力を有し、インクルージョンボディの効率的なリフォールディング方法において有用である、4) 本発明のリフォールディング剤に接触させ、不活性タンパク質の機能を賦活する方法は、タンパク質を構成するアミノ酸の鎖長・配列を問わず、種々の変性タンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかもリフォールディング率の高い効率的な方法である、5) 本発明のリフォールディング剤を構成するゼオライトベータは、低コストであり、しかも、繰り返し使用可能である、6) 本発明のリフォールディング剤を用いる不活性タンパク質の機能賦活方法は、分子量10

万を越える大型のタンパク質を含む、種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォールディングに適用できる、7)例えば、大腸菌の発現系によるタンパク質合成プロセスと、本発明のリフォールディング剤による不活性タンパク質の機能賦活とを組み合わせることにより、高次構造が制御されて、該タンパク質固有の本来機能が備わったタンパク質を生産する新規の活性タンパク質製造プロセスを提案・確立することができる、という格別の効果が奏される。

発明を実施するための最良の形態

[0048] 次に、実施例及び比較例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例等によって何ら限定されるものではない。

[0049] 本発明の第1の態様の実施例及び比較例

以下、本実施例では、大腸菌発現系生産タンパク質及び変性タンパク質の機能賦活を説明するが、本発明は、これら実施例に限定・制限されるものではない。

1) 試料等の調製

(a) 機能賦活剤

機能賦活剤として、後記する表1に示した未焼成ゼオライトベータ(Na-BEA)、表1に示した合成ゼオライトベータ、及びそれを焼成した焼成ゼオライトベータ及び表1の比較例1〜15に示した比較製品を使用した。

(b) 変性タンパク質溶液

タンパク質として、表1の「タンパク質」及び「備考」に示した内容のRPA70(黄色シヨウジョウバエ由来)、P53(ヒト由来)等を使用した。

(c) リフォールディングバッファー

ゼオライトとしてNa-BEA、タンパク質としてRPA70を用いて、リフォールディングバッファーの塩濃度を検討した。リフォールディングバッファーは、20mM Tris HCl pH7.5、0.5M NaCl、20mM 2-メルカプトエタノール、2.5(w/v)% polyethylene glycol 20,000、非イオン系界面活性剤を用い、界面活性剤としては1(v/v)% Tween20、Triton X-100、及びNP-40を用いた。後記する表2に、実施例及び比較例で実際に用いたリフォールディングバッファーの詳細を示す。

[0050] 2) リフォールディング操作

1. 5mlのエッペンドルフチューブに100mgの機能賦活剤を入れ、0.5mlの6M塩酸グアニジン、20mM トリスアミノメタン三塩酸塩 (TrisHCl) pH7.5、0.5M NaCl、及び20mM 2-メルカプトエタノールを加えて懸濁した。これに、6M塩酸グアニジン、及び20mM 2-メルカプトエタノールを加え、氷上で1時間放置し、変性したタンパク質溶液(濃度は0.5〜1.0mg/ml)を0.5ml加えた。この混合液を、該タンパク質の機能賦活剤上への吸着を確実にするために、低温室に置かれたROTARY CULTURE RCC-100(IWAKI GLASS社製)で、1時間攪拌した。

[0051] その後、10000×gで5秒間遠心して、機能賦活剤を沈殿させ、上澄みを除去した。次に、この沈殿した機能賦活剤からタンパク質変性剤を完全に除去するために、これを1mlの20mM TrisHCl pH7.5、20mM 2-メルカプトエタノールで4回洗った後、10000×gで5秒間遠心し、更に、生じた上澄みを捨てた。残った機能賦活剤に、1mlのリフォールディングバッファー(50mM HEPES pH7.5、0.5M NaCl、20mM 2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子及び非イオン系界面活性剤から構成)を加え、懸濁した。

[0052] 機能賦活剤上に吸着した該タンパク質を脱着・溶離させるために、この懸濁液を再び低温下のROTARY CULTURE RCC-100(IWAKI GLASS社製)で攪拌した。その後、10000×gで5秒間遠心して、機能賦活剤を沈殿させ、該タンパク質を含む上澄みを新しいエッペンドルフチューブに移し、活性測定(アッセイ)に用いた。

なお、活性測定には、用いたタンパク質の働きに応じた方法を採用した。具体的には、三種の測定、すなわちゲルシフトアッセイ、ポリメラーゼアッセイ及びリゾチーム活性測定で行った。

[0053] 3) 活性測定操作

(a) ゲルシフトアッセイ

1pmolの放射性同位体で標識したオリゴヌクレオチドDNAとリフォールディングしたタンパク質を、組成25mM HEPES pH7.4、50mM KCl、20% glycerol、0.1% NP-40、1mM DTT、及び1mg/ml bovine serum albuminの溶液中で、氷上30分インキュベートし、4.5%のポリアクリルアミノゲルで0.5×TBEのバッファーを使い、4℃で電気泳動した。その結果を図1、及び図3に示す。

タンパク質にDNA結合性がある(すなわち活性がある)場合、DNAにタンパク質が結合し、これにより、電気泳動が遅くなり、バンドがシフトするので、これにより活性(すなわちリフォールディング率)を判定した。

[0054] (b) ポリメラーゼアッセイ

鋳型DNAとして、poly(dA) oligo(dT)₁₂₋₁₈、あるいはDNase I-activate calf thymus DNAを使用し、反応液には、組成(終濃度) 50nmM TrisHCl pH7.5、1mM DTT、15% glycerol、5mM MgCl₂、0.5 μM dTTP(cold) (チミジル酸三リン酸)、[³H]-dTTP (5mCi/ml: 100-500cpm/pmol) のものを用いた。まず、この反応液の濃度が2倍のもの10 μlにタンパク質(酵素)サンプル溶液を加え、懸濁した後37℃で1時間インキュベートした後、氷上に置き反応を停止させた。

[0055] その後、正方形に切ったDE81紙に反応液を滴下し、乾燥させた後、ビーカーの中に移して、未反応dTTPを溶解除去するために洗浄した。洗浄は、まず5%リン酸水素二ナトリウム水溶液で3回洗い、次いで、蒸留水で3回、更に、エタノールで2回洗い、その後、乾燥した。このようにして得た乾燥DE81紙を、シンチレーターが入ったバイアルに入れ、シンチレーションカウンターで放射活性(cpm)を測定した。酵素サンプルの活性が強いほど、それで合成されるDNAに放射性同位体で標識したdTTPがより多く取り込まれ放射活性が高くなるので、これにより、タンパク質の活性を判定した。図2に、Tween20を用いてリフォールディングされたタンパク質の回収率、及び活性の回復率を示す。

[0056] (c) リゾチームの活性測定

基質に細菌M. lysodeikticusを選び、これを50mMリン酸バッファーで懸濁し、0.16mg/ml濃度の基質溶液を調製した。この基質溶液480 μlに20 μlのタンパク質(酵素リゾチーム)溶液を加え、室温で30分間インキュベートした。その後、波長450nmの吸光度を測定した。

リゾチームは細菌の細胞壁を分解する能力があるので、その能力、すなわち活性が高いほど吸光度は減少する。リゾチーム活性1 unitは1分間あたりに450nmの吸光度が0.001減少することと定義した。

[0057] 上記手順・操作で得られた本実施例の結果である、活性(リフォールディング率)、

タンパク質回収率を、表1に、比較例の結果と共に纏めた。尚、実施例及び比較例で用いたリフォールディングバッファーを表2に示す。実施例に示されるように、リフォールディングにより、DNA結合活性等のタンパク質本来の活性が得られることが分かった。本発明は、種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用できる、一般性、普遍性の高いリフォールディング法として有用であり、その適用は、実施例に示されたタンパク質に限定されるものではなく、任意のタンパク質に適用し得るものである。

[0058] [表1]

[0059] [表2]

機能賦活剤		タンパク質	活性 (リポソーム等): タバコ質回収率	備考
実施例 1	未焼成ゼライトベータ (市販品 Na-8EA)	同上	DNA結合活性有 (大)	大腸菌で合成し沈殿したものを使用、分子量 66kDa
実施例 2	同上	同上	DNA結合活性有 (中)	図1参照
実施例 3	同上	同上	DNA結合活性有 (小)	図1参照
実施例 4	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 約90%; 20%	図1参照
実施例 5	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	図2参照
実施例 6	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	図2参照
実施例 7	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 約80%; 16%	図2参照
実施例 8	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 95%強; 23%	図2参照
実施例 9	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 約95%; 22%	図2参照
実施例 10	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 90%強; 19%	図3参照
実施例 11	同上	同上	DNA結合活性有 (小)	図3参照
実施例 12	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 100%	図3参照
実施例 13	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 100%	図3参照
実施例 14	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 約100%	図3参照
実施例 15	同上	同上	DNA結合活性有 (中): 49.3%	
実施例 16	同上	同上	DNA結合活性有 (中): 64.7%	
実施例 17	同上	同上	DNA結合活性有 (中): 64.4%	
実施例 18	同上	同上	DNA結合活性有 (中): 39.2%	
実施例 19	同上	同上	DNA結合活性有 (中): 72.2-77.4%	
実施例 20	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 24.3%	
実施例 21	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	
実施例 22	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	
実施例 23	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	
実施例 24	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	
実施例 25	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	
実施例 26	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	
実施例 27	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	
実施例 28	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	
実施例 29	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	
実施例 30	同上	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 1	ゼライト K-LTL	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 2	ゼライト H-Y	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 3	ゼライト H-USY330	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 4	ゼライト H-USY380	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 5	ゼライト K-FER	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 6	Na-LSX	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 7	RUB-15	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 8	Na-FAU	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 9	カネマイト⑨	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 10	HOM (pore 7nm)	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 11	HOM (pore 5nm)	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 12	HOM (pore 6nm)	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 13	PLS	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 14	MCM-22	同上	DNA結合活性有 (大)	
比較例 15	MCM-22	同上	DNA結合活性有 (大)	

大腸菌で合成し沈殿したものを使用
大腸菌で合成し沈殿したものを使用、分子量 110kDa
大腸菌で合成した可溶性のもの (分子量 39kDa) を 6M 塩酸 7-2 ジンと 20mM 2-メルカプトエタノールで変性 (ホリラーゼ活性: 0 CPM) 6M 塩酸 7-2 ジンと 20mM 2-メルカプトエタノールで変性 (活性 unit は 0)、分子量 14kDa
合成したままのゼオライトベータ (未焼成、水洗浄、乾燥のみ)
合成ゼオライトベータを焼成: 条件、300°C/10h
合成ゼオライトベータを焼成: 条件、400°C/8h
合成ゼオライトベータを焼成: 条件、450°C/6h
合成ゼオライトベータを焼成: 条件、500°C/3h

Na-LSX: 低シリカゼオライト X

HOM: メソポーラスシリケートの 1 種

PLS: 層状シリケートの 1 種
層状型ゼオライトの 1 種

		リフォールディングバッファー	
		50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子/非イオン系界面活性剤	
実施例	1	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子無/1(v/v)% Tween 20	
実施例	2	50mM HEPES pH7.5/0.2M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子無/1(v/v)% Tween 20	
実施例	3	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子無/1(v/v)% Tween 20	
実施例	4	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Triton X-100	
実施例	5	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% NP-40	
実施例	6	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/0.5(v/v)% Tween 20	
実施例	7	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/2(v/v)% Tween 20	
実施例	8	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/3(v/v)% Tween 20	
実施例	9	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/5(v/v)% Tween 20	
実施例	10	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/10(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	11	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/5.0(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	12	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	13	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	14	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PEG3350/1(v/v)% Tween 20	
実施例	15	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/10.0(w/v)%PEG200/1(v/v)% Tween 20	
実施例	16	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	17	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PPG2000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	18	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/5.0(w/v)%PPG400/1(v/v)% Tween 20	
実施例	19	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0-5.0%Ficoll70/1(v/v)% Tween 20	
実施例	20	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.1% β -cyclodextrin/1(v/v)% Tween 20	
実施例	21	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	22	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/2(v/v)% Tween 20	
実施例	23	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	24	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	25	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	26	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	27	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	28	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	29	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	30	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	1	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	2	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	3	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	4	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	5	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	7	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	8	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	9	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	10	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	11	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	12	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	13	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	14	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	15	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/2(v/v)% Tween 20	

[0060] 本発明の第2の態様の実施例及び比較例

以下、本実施例では、大腸菌発現系生産タンパク質及び変性タンパク質の機能賦活を説明するが、本発明は、これら実施例に限定・制限されるものではない。

1) 試料等の調製

(a) リフォールディング剤

本発明のリフォールディング剤(機能賦活剤)として、後記する表3、4に示した、市販ゼオライトベータ、合成ゼオライトベータ、それらを焼成したゼオライトベータ、各種アンモニウム類含有ゼオライトベータ、骨格置換ゼオライトベータ及び各種アンモニウム類含有骨格置換ゼオライトベータを使用した。比較品として、表5の比較例に列挙した物質を用いた。これらの物質は、ベータ構造を有するゼオライトではない。例えば

、比較例19、20のゼオライトは、合成時間が充分ではなく、BEA構造が未形成のシリカ及びシリカ・アルミナで、大半は非晶質構造である。

[0061] (b) 変性タンパク質溶液

活性賦活対象タンパク質として、表3～5のタンパク質及び備考欄に示した内容のRP70(黄色ショウジョウバエ由来)、P53(ヒト由来)等を使用した。

(c) リフォールディングバッファー

一般には、リフォールディングバッファーとして、50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/ 20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)% ポリエチレングリコール20000(リフォールディング因子)/1(v/v)% Tween20(界面活性剤)の組成の液を用いた。表6～8に、用いたリフォールディングバッファーの詳細を示す。

[0062] 2) リフォールディング操作

1.5mlのエッペンドルフチューブに100mgの機能賦活剤を入れ、0.5mlの6M塩酸グアニジン・20mMトリスアミノメタン三塩酸塩(TrisHCl) pH7.5・0.5M NaCl・20mM 2-メルカプトエタノールを加えて懸濁した。これに、6M塩酸グアニジン・20mM 2-メルカプトエタノールを加え、氷上で1時間放置し、変性したタンパク質溶液(濃度は0.5～1.0mg/ml)を0.5ml加えた。この混合液を、該タンパク質の機能賦活剤上への吸着を確実にするために、低温室に置かれたROTARY CULTURE RCC-100(IWAKI GLASS社製)で、1時間攪拌した。

[0063] その後、10000×gで5秒間遠心して、機能賦活剤を沈殿させ、上澄みを除去した。次に、この沈殿した機能賦活剤からタンパク質変性剤を完全に除去するために、これを1mlの20mM TrisHCl pH7.5・20mM 2-メルカプトエタノールで4回洗った後、10000×gで5秒間遠心し、更に、生じた上澄みを捨てた。残った機能賦活剤に、1mlのリフォールディングバッファー(50mM HEPES pH7.5、0.5M NaCl、20mM 2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子及び非イオン系界面活性剤から構成)を加え、懸濁した。

[0064] 機能賦活剤上に吸着した該タンパク質を脱着・溶離させるために、この懸濁液を再び低温下のROTARY CULTURE RCC-100(IWAKI GLASS社製)で攪拌した。その後、10000×gで5秒間遠心して、機能賦活剤を沈殿させ、該タンパク質を含む上澄みを

新しいエッペンドルフチューブに移し、活性測定(アッセイ)に用いた。

なお、活性測定には、用いたタンパク質の働きに応じた方法を採用した。具体的には、4種の測定、すなわち、ゲルシフトアッセイ、ポリメラーゼアッセイ、リゾチーム活性測定及びトポイソメラーゼI活性測定で行った。

[0065] 3) 活性測定操作

(a) ゲルシフトアッセイ

1pmolの放射性同位体で標識したオリゴヌクレオチドDNAとリフォールディングしたタンパク質を、組成25mM HEPES pH7.4・50mM KCl・20% glycerol・0.1% NP-40・1mM DTT・1mg/ml bovine serum albuminの溶液中で、氷上30分インキュベートし、4.5%のポリアクリルアミノゲルで0.5×TBEのバッファーを使い、4℃で電気泳動した。

タンパク質にDNA結合性がある(すなわち、活性がある)場合、DNAにタンパク質が結合し、これにより電気泳動が遅くなりバンドがシフトするので、これにより活性(すなわち、リフォールディング率)を判定した。

[0066] (b) ポリメラーゼアッセイ

鋳型DNAとして、poly(dA)oligo(dT)₁₂₋₁₈ あるいはDNase I-activate calf thymus DNAを使用し、反応液には、組成(終濃度)50mM TrisHCl pH7.5・1mM DTT・15% glycerol・5mM MgCl₂・0.5 μM dTTP (cold)(チミジル酸三リン酸)・[³H]-dTTP (5mCi/ml: 100-500cpm/pmol)のものをを用いた。まず、この反応液の濃度が2倍のもの10 μlに、タンパク質(酵素)サンプル溶液を加え、懸濁した後、37℃で1時間インキュベートした後、氷上に置き反応を停止させた。

[0067] その後、正方形に切ったDE81紙に反応液を滴下し、乾燥させた後、ピーカーの中に移して、未反応dTTPを溶解除去するために洗浄した。洗浄は、まず、5%リン酸水素二ナトリウム水溶液で3回洗い、次いで、蒸留水で3回、更に、エタノールで2回洗い、その後、乾燥した。このようにして得た乾燥DE81紙を、シンチレーターが入ったバイアルに入れ、シンチレーションカウンターで放射活性(cpm)を測定した。酵素サンプルの活性が強いほど、それで合成されるDNAに、放射性同位体で標識したdTTPがより多く取り込まれ、放射活性が高くなるので、これによりタンパク質の活性を判定した。

[0068] (c) リゾチームの活性測定

基質に細菌 *M. lysodeikticus* を選び、これを 50mM リン酸バッファーで懸濁し、0.16mg/ml 濃度の基質溶液を調製した。この基質溶液 480 μ l に 20 μ l のタンパク質 (酵素 リゾチーム) 溶液を加え、室温で 30 分間インキュベートした。その後、波長 450nm の吸光度を測定した。

リゾチームは、細菌の細胞壁を分解する能力があるので、その能力、すなわち、活性が高いほど吸光度は減少する。リゾチーム活性 1 unit は、1 分間あたりに 450nm の吸光度が 0.001 減少することと定義した。

[0069] (d) トポイソメラーゼ I 活性測定

0.5 μ g の supercoiled pBR322 と、トポイソメラーゼ (Topoisomerase) I タンパク質を反応バッファー (10mM TrisHCl, pH7.5, 150mM NaCl, 5mM β -mercaptoethanol, 0.5mM EDTA) に懸濁し、37°C で 30 分インキュベーションした後、0.1% SDS を添加し反応を停止した。次に、これに 0.5 μ g/ml proeinase K を添加し、37°C で 30 分インキュベーションし、液中のタンパク質 トポイソメラーゼ I を分解した。この後、この液を、1%(w/v) アガロースで電気泳動し、0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイドで DNA 染色し、UV トランスイルミネーターで上方にシフトした DNA のバンドを確認することによって、トポイソメラーゼ I 活性測定を行った。

[0070] 上記手順・操作で得られた本実施例の結果である、活性 (リフォールディング率)、タンパク質回収率を、表 3、4 に、比較例の結果を、表 5 に纏めた。実施例に示されるように、リフォールディングにより、DNA 結合活性等のタンパク質本来の活性が得られることが分かった。本発明のゼオライトベータは、種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用できる、一般性、普遍性の高い、リフォールディング剤として有用であり、その適用は、実施例に示されたタンパク質に限定されるものではなく、任意のタンパク質に適用し得るものである。

[0071] [表 3]

[0073] [表5]

実施例	機能賦活剤	タンパク質	活性 (リポソーム形成率): タンパク質回収率	備考
26	焼成ゼオライトベータ	RPA70 (黄色シヨウジヨハニ由来)	DNA結合活性有 (小)	焼成条件: 300°C/10h
27	同上	同上	DNA結合活性有 (小)	焼成条件: 400°C/8h
28	同上	同上	DNA結合活性有 (小)	焼成条件: 450°C/6h
29	同上	同上	DNA結合活性有 (小)	焼成条件: 500°C/3h
30	未焼成ゼオライトベータ (B EA: アミンTEA含有)	同上	DNA結合活性有 (大)	
31	同上	DNA ポリメラーゼ 8 (イネ由来) アミン/酸配列 1-50 欠損	ポリメラーゼ活性: 反応時間1時間, 16641DP 大腸菌で合成し沈殿したものを使用、分子量120kDa、実施例2 4と同じ方法で活性を測定	
32	ゼオライトベータ (no template: アミンなし)	RPA70 (黄色シヨウジヨハニ由来)	DNA結合活性有 (小)	
33	ゼオライトベータ (アミン: TBA)	同上	DNA結合活性有 (小)	
34	ゼオライトベータ (アミン: TMA)	同上	DNA結合活性有 (大)	
35	ゼオライトベータ (アミン: TEA)	同上	DNA結合活性有 (大)	
36	ゼオライトベータ (アミン: TPA)	同上	DNA結合活性有 (大)	
37	ゼオライトベータ (アミン: ピリジン)	同上	DNA結合活性有 (小)	
38	Si-rich BEA	RPA70 (黄色シヨウジヨハニ由来)	DNA結合活性有 (小)	
39	Al-rich BEA	同上	DNA結合活性有 (小)	
40	Co BEA	同上	DNA結合活性有 (小)	
41	Ti BEA	同上	DNA結合活性有 (小)	
42	BEA-アンモニウム	同上	DNA結合活性有 (小)	
43	BEA-尿素	同上	DNA結合活性有 (小)	
44	NaBEA, 135°C, 27h	同上	DNA結合活性有 (小)	
45	NaBEA, 96h	同上	DNA結合活性有 (小)	
46	NaBEA	Topoisomerase I (黄色シヨウジヨハニ由来)	DNA relax 活性有 (大): 89%	分子量: 112kD. 活性の比較は大腸菌で可溶性画分でとれたものを使用。Refoldingしたものは、大腸菌で合成し沈殿したものを使用。

[0074] [表6]

	機能賦活剤	タンパク質	活性(リフォールディング率);タンパク質回収率	備考
比較例 1	ゼオライト K-LTL	RPA70(黄色ゾグゾウハエ由来)	DNA結合活性無	
比較例 2	ゼオライト H-Y	同上	DNA結合活性無	
比較例 3	ゼオライト H-USY330	同上	DNA結合活性無	
比較例 4	ゼオライト H-USY360	同上	DNA結合活性無	
比較例 5	ゼオライト K-FER	同上	DNA結合活性無	
比較例 7	Na-LSX	同上	DNA結合活性無	Na-LSX:低シリカゼオライトX
比較例 8	RUB-15	同上	DNA結合活性無	
比較例 9	Na-FAU	同上	DNA結合活性無	
比較例 10	カネマイト®	同上	DNA結合活性無	
比較例 11	HOM(pore 7nm)	同上	DNA結合活性無	HOM:マンボーマスシリケートの1種
比較例 12	HOM(pore 5nm)	同上	DNA結合活性無	
比較例 13	HOM(pore 8nm)	同上	DNA結合活性無	
比較例 14	PLS	同上	DNA結合活性無	PLS:層状シリケートの1種
比較例 15	MCM-22	同上	DNA結合活性無	
比較例 16	FER-TEA	同上	DNA結合活性無	
比較例 17	MOR-TEA	同上	DNA結合活性無	
比較例 18	FER-ピリジン	同上	DNA結合活性無	
比較例 19	ゼオライトベータ構造 未形成シリカ(BEA 135°C, 24h)J GaBEA	同上	DNA結合活性無	
比較例 20		RPA70(黄色ゾグゾウハエ由来)	DNA結合活性無	

		リフォールディングバッファー	
		50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子/非イオン系界面活性剤	
実施例	1	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子無/1(v/v)% Tween 20	
実施例	2	50mM HEPES pH7.5/0.2M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子無/1(v/v)% Tween 20	
実施例	3	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子無/1(v/v)% Tween 20	
実施例	4	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	5	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Triton X-100	
実施例	6	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% NP-40	
実施例	7	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/0.5(v/v)% Tween 20	
実施例	8	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/2(v/v)% Tween 20	
実施例	9	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/3(v/v)% Tween 20	
実施例	10	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/5(v/v)% Tween 20	
実施例	11	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/10(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	12	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/5.0(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	13	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	14	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	15	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PEG3350/1(v/v)% Tween 20	
実施例	16	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/10.0(w/v)%PEG200/1(v/v)% Tween 20	
実施例	17	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	18	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PPG2000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	19	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/5.0(w/v)%PPG400/1(v/v)% Tween 20	
実施例	20	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0-5.0%Ficoll70/1(v/v)% Tween 20	
実施例	21	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.1% β -cyclodextrin/1(v/v)% Tween 20	
実施例	22	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	23	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	24	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	25	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	

[0075] [表7]

		リフォレンジングバッファー	
実施例 26	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 27	50mM	HEPES pH7.5/0.1M	NaCl/20mM
実施例 28	50mM	HEPES pH7.5/0.1M	NaCl/20mM
実施例 29	50mM	HEPES pH7.5/0.1M	NaCl/20mM
実施例 30	50mM	HEPES pH7.5/0.1M	NaCl/20mM
実施例 31	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 32	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 33	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 34	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 35	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 36	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 37	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 38	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 39	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 40	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 41	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 42	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 43	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 44	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 45	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM
実施例 46	50mM	HEPES pH7.5/0.5M	NaCl/20mM

[0076] [表8]

リフォールディングバッファー		リフォールディング因子/非イオン系界面活性剤	
比較例 1	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 2	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 3	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 4	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 5	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 7	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 8	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 9	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 10	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 11	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 12	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 13	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 14	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 15	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 16	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 17	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 18	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 19	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20
比較例 20	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	20

[0077] 本発明の第3の態様の実施例及び比較例

以下、本実施例では、大腸菌発現系生産タンパク質及び変性タンパク質の機能賦活を説明するが、本発明は、これら実施例に限定・制限されるものではない。

1) 試料等の調製

(a) リフォールディング剤

リフォールディング剤(機能賦活剤)として、後記する表9、10に示した、市販ゼオライトベータ、合成ゼオライトベータ、それらを焼成したゼオライトベータ、各種アンモニウム類含有ゼオライトベータ、骨格置換ゼオライトベータ及び各種アンモニウム類含有骨格置換ゼオライトベータを使用した。比較品として、表13の比較例に列挙した物質を用いた。これらの物質は、ベータ構造を有するゼオライトではない。例えば、比較例19、20の物質は合成時間が充分ではなく、BEA構造が未形成のシリカ及びシリカ・アルミナで、大半は非晶質構造である。

[0078] (b) 変性タンパク質溶液

活性賦活対象タンパク質として、表9、10のタンパク質及びRP70(黄色ショウジョウバエ由来)、P53(ヒト由来)等を使用した。

(c) リフォールディングバッファー

一般には、リフォールディングバッファーとして、50mM HEPES pH7.5 / 0.5M NaCl / 20mM 2-メルカプトエタノール / 2.5(w/v)% ポリエチレングリコール 20000(リフォールディング因子) / 1(v/v)% Tween20(界面活性剤)の組成の液を用いた。表11、12、14に、用いたリフォールディングバッファーの詳細を示す。

[0079] 2) リフォールディング操作

1. 5mlのエッペンドルフチューブに、100mgのリフォールディング剤を入れ、0.5mlの6M塩酸グアニジン・20mMトリスアミノメタン三塩酸塩(TrisHCl) pH7.5・0.5M NaCl・20mM 2-メルカプトエタノールを加えて懸濁した。これに、6M塩酸グアニジン・20mM 2-メルカプトエタノールを加え、氷上で1時間放置し、変性したタンパク質溶液(濃度は0.5〜1.0mg/ml)を0.5ml加えた。この混合液を、該タンパク質のリフォールディング剤上への吸着を確実にするために、低温室に置かれた旋回培養器(ROTARY CULTURE RCC-100:IWAKI GLASS社製)で、1時間攪拌した。

[0080] その後、10000×gで5秒間遠心して、リフォールディング剤を沈殿させ、上澄みを除去した。次に、この沈殿したリフォールディング剤からタンパク質変性剤を完全に除去するために、これを1mlの20mM TrisHCl pH7.5・20mM 2-メルカプトエタノールで4回洗った後、10000×gで5秒間遠心し、生じた上澄みを捨てた。残ったリフォ

ールディング剤に、1mlのリフォールディングバッファー(50mM HEPES pH7. 5、0. 5M NaCl、20mM 2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子及び非イオン系界面活性剤から構成)を加え、懸濁した。

- [0081] リフォールディング剤上に吸着した該タンパク質を脱着・溶離させるために、この懸濁液を、再び低温下の旋回培養器(ROTARY CULTURE RCC-100:IWAKI GLASS社製)で攪拌した。その後、10000×gで5秒間遠心して、リフォールディング剤を沈殿させ、該タンパク質を含む上澄みを、新しいエッペンドルフチューブに移し、活性測定(アッセイ)に用いた。

なお、活性測定には、用いたタンパク質の働きに応じた方法を採用した。具体的には、4種の測定、すなわち、ゲルシフトアッセイ、ポリメラーゼアッセイ、リゾチーム活性測定及びトポイソメラーゼI活性測定で行った。

[0082] 3) 活性測定操作

(a) ゲルシフトアッセイ

1pmolの放射性同位体で標識したオリゴヌクレオチドDNAとリフォールディングしたタンパク質を、組成25mMHEPES pH7. 4・50mM KCl・20%glycerol・0. 1%NP-40・1mMDTT・1mg/mlウシ血清アルブミン(bovine serum albumin)の溶液中で、氷上30分インキュベートし、4. 5%のポリアクリルアミノゲルで0. 5×TBEのバッファーを使い、4℃で電気泳動した。

タンパク質にDNA結合性がある(すなわち、活性がある)場合、DNAにタンパク質が結合し、これにより電気泳動が遅くなりバンドがシフトするので、これにより活性(すなわち、リフォールディング率)を判定した。

[0083] (b) ポリメラーゼアッセイ

鋳型DNAとして、poly(dA) oligo(dT)_{12~18}あるいはDNアーゼ1(DNase1)-活性化仔牛胸腺DNA(activate calf thymus DNA)を使用し、反応液には組成(終濃度)50mM TrisHClpH7. 5・1mM DTT・15%glycerol・5mM MgCl₂・0. 5μM dTTP(cold)(チミジル酸三リン酸)・³H]-dTTP(5mCi/ml:100-500cpm/pmol)のものをを用いた。先ず、この反応液の濃度が2倍のもの10μlに、タンパク質(酵素)サンプル溶液を加え、懸濁した後37℃で1時間インキュベートした後、氷上に置き反応を

停止させた。

[0084] その後、正方形に切ったDE81紙に反応液を滴下し、乾燥させた後、ビーカーの中に移して、未反応dTTPを溶解除去するために洗浄した。洗浄は、先ず5%リン酸水素二ナトリウム水溶液で3回行い、次いで、蒸留水で3回、更にエタノールで2回行い、その後、乾燥した。このようにして得た乾燥DE81紙を、シンチレーターが入ったバイアルに入れ、シンチレーションカウンターで放射活性(cpm)を測定した。酵素サンプルの活性が強いほど、それで合成されるDNAに放射性同位体で標識したdTTPがより多く取り込まれ、放射性が高くなるので、これによりタンパク質の活性を判定した。

[0085] (c) リゾチームの活性測定

基質に細菌*M. lysodeikticus*を選び、これを50mMリン酸バッファーで懸濁し、0.16mg/ml濃度の基質溶液を調製した。この基質溶液480 μ lに、20 μ lのタンパク質(酵素リゾチーム)溶液を加え、室温で30分間インキュベートした。その後、波長450nmの吸光度を測定した。

リゾチームは細菌の細胞壁を分解する能力があるので、その能力、すなわち、活性が高いほど吸光度は減少する。リゾチーム活性1unitは1分間あたりに450nmの吸光度が0.001減少することと定義した。

[0086] (d) トポイソメラーゼI活性測定

0.5 μ gのsupercoiled pBR322とトポイソメラーゼI (Topoisomerase I) タンパク質を、反応バッファー(10mM TrisHCl pH7.5, 150mM NaCl, 5mM β -mercaptoethanol, 0.5mM EDTA)に懸濁し、37°Cで30分インキュベーションした後、0.1% SDSを添加し、反応を停止した。次に、これに0.5 μ g/mlプロテイナーゼK (proteinase K)を添加し、37°Cで30分インキュベーションし、液中のタンパク質トポイソメラーゼIを分解した。この後、この液を1% (w/v) アガロースで電気泳動し、0.5 μ g/mlのエチジウムブロマイドでDNA染色し、UVトランスイルミネーターで上方にシフトしたDNAのバンドを確認することによって、トポイソメラーゼI活性測定を行った。

[0087] 上記手順・操作で得られた本実施例の結果である、活性(リフォールディング率)、タンパク質回収率等を、表9、10、13に、比較例と共に纏めた。実施例に示されるよ

うに、リフォールディングにより、DNA結合活性等のタンパク質本来の活性が得られることが分かった。本発明のリフォールディング剤は、種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用できる、一般性、普遍性の高いリフォールディング剤として有用であり、その適用は、実施例に示されたタンパク質に限定されるものではなく、任意のタンパク質に適用し得るものである。

[0088] [表9]

機能賦活剤		タンパク質		活性(リファレンシング率): タンパク質回収率	備考
実施例 1	未焼成ゼライトペーダー (BE A:アミンTEA含有)	RPA70 (黄色ショウジョウバエ由来)	DNA結合活性有 (大)	大腸菌で合成し沈殿したものを使用、分子量 66kDa	
実施例 2	同上	同上	DNA結合活性有 (中)		
実施例 3	同上	同上	DNA結合活性有 (小)		
実施例 4	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 約90%; 20%		
実施例 5	同上	同上	DNA結合活性有 (大)		
実施例 6	同上	同上	DNA結合活性有 (大)		
実施例 7	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 約80%; 16%		
実施例 8	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 95%強; 23%		
実施例 9	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 約95%; 22%		
実施例 10	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 90%強; 19%		
実施例 11	同上	同上	DNA結合活性有 (小)		
実施例 12	同上	同上	DNA結合活性有 (大)		
実施例 13	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 100%		
実施例 14	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 100%		
実施例 15	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 約100%		
実施例 16	同上	同上	DNA結合活性有 (中): 49.3%		
実施例 17	同上	同上	DNA結合活性有 (中): 64.7%		
実施例 18	同上	同上	DNA結合活性有 (中): 64.4%		
実施例 19	同上	同上	DNA結合活性有 (中): 39.2%		
実施例 20	同上	同上	DNA結合活性有 (大): 72.2-77.4%		
実施例 21	同上	同上	DNA結合活性有 (小): 24.3%		
実施例 22	同上	同上	DNA結合活性有 (大)		
実施例 23	同上	DNAホリラーゼ α ・catalytic subunit core domain (マウス由来)	ホリラーゼ活性: 反応時間1時間, 1866DPM; 反応時間2時間, 3938DPM	大腸菌で合成し沈殿したものを使用 大腸菌で合成し沈殿したものを使用、分子量 110kDa	
実施例 24	同上	変性DNAホリラーゼ β (ラット由来)	ホリラーゼ活性: 反応時間1時間, 1128000 CPM	大腸菌で合成した可溶性のもの(分子量39kDa)を 8M塩酸 Guanidinium と20mM 2-メルカプトエタノールで変性 (ホリラーゼ活性: 0 CPM)	
実施例 25	同上	市販品リゾチーム変性タンパク質 (ニワトリ 卵白由来)	リゾチーム活性 (unit): 24.5	8M塩酸 Guanidinium と20mM 2-メルカプトエタノールで変性 (活性unitは0)、分子量14kDa	
実施例 26	焼成ゼライトペーダー	RPA70 (黄色ショウジョウバエ由来)	DNA結合活性有 (小)	焼成条件: 300°C/10h	
実施例 27	同上	同上	DNA結合活性有 (小)	焼成条件: 400°C/8h	
実施例 28	同上	同上	DNA結合活性有 (小)	焼成条件: 450°C/6h	
実施例 29	同上	同上	DNA結合活性有 (小)	焼成条件: 500°C/3h	
実施例 30	未焼成ゼライトペーダー (BE A:アミンTEA含有)	同上	DNA結合活性有 (大)		

[0089] [表10]

実施例	機能賦活剤	タンパク質	活性 (リファレンス) : タバコ		備考
			質回収率	質回収率	
31	同上	DNA ポリメラーゼ δ (イネ由来) / ミノ酸配列 1-50 欠損	ポリメラーゼ活性: 反応時間 1 時 120kDa、実施例 24 と同じ方法で活性を測定		
32	ゼオライトベータ (no template: アミンなし)	RPA70 (黄色) / ヨウハ・I 由来	DNA 結合活性有 (小)		
33	ゼオライトベータ (アミン: TBA)	同上	DNA 結合活性有 (小)		
34	ゼオライトベータ (アミン: TMA)	同上	DNA 結合活性有 (大)		
35	ゼオライトベータ (アミン: TEA)	同上	DNA 結合活性有 (大)		
36	ゼオライトベータ (アミン: TPA)	同上	DNA 結合活性有 (小)		
37	ゼオライトベータ (アミン: ピリジン)	RPA70 (黄色) / ヨウハ・I 由来	DNA 結合活性有 (小)		
38	Si-rich BEA	同上	DNA 結合活性有 (小)		
39	Al-rich BEA	同上	DNA 結合活性有 (小)		
40	Co BEA	同上	DNA 結合活性有 (小)		
41	Ti BEA	同上	DNA 結合活性有 (小)		
42	BEA-アンモニウム	同上	DNA 結合活性有 (小)		
43	BEA-尿素	同上	DNA 結合活性有 (小)		
44	NaBEA, 135°C, 27h	同上	DNA 結合活性有 (小)		
45	NaBEA, 96h	同上	DNA 結合活性有 (小)		
46	NaBEA	Topoisomerase I (黄色) / ヨウハ・I 由来	DNA relax 活性有 (大): 89%		分子量: 112kD。活性の比較は大腸菌で可溶性画分で行ったものを使用。Refoldingしたものは、大腸菌で合成し沈殿したものを使用。
47	ゼオライトベータ (アミン: モノメチル)	RPA70 (黄色) / ヨウハ・I 由来	DNA 結合活性有 (小)		
48	ゼオライトベータ (アミン: ジメチル)	同上	DNA 結合活性有 (中)		
49	ゼオライトベータ (アミン: トリメチル)	同上	DNA 結合活性有 (中)		
50	ゼオライトベータ (アミン: モノエチル)	同上	DNA 結合活性有 (中)		
51	ゼオライトベータ (アミン: ジエチル)	同上	DNA 結合活性有 (大)		
52	ゼオライトベータ (アミン: トリエチル)	同上	DNA 結合活性有 (中)		
53	ゼオライトベータ (アミン: モノプロピル)	同上	DNA 結合活性有 (大)		
54	ゼオライトベータ (アミン: ジプロピル)	同上	DNA 結合活性有 (大)		
55	ゼオライトベータ (アミン: トリプロピル)	同上	DNA 結合活性有 (大)		
56	ゼオライトベータ (アミン: モノブチル)	同上	DNA 結合活性有 (大)		
57	ゼオライトベータ (アミン: ジブチル)	同上	DNA 結合活性有 (大)		
58	ゼオライトベータ (アミン: トリブチル)	同上	DNA 結合活性有 (大)		

[0090] [表11]

リフォルディングバッファー			
	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/リフォルディング因子/非イオン系界面活性剤
実施例 1	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/リフォルディング因子無/1(v/v)% Tween 20
実施例 2	50mM HEPES	pH7.5/0.2M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/リフォルディング因子無/1(v/v)% Tween 20
実施例 3	50mM HEPES	pH7.5/0.1M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/リフォルディング因子無/1(v/v)% Tween 20
実施例 4	50mM HEPES	pH7.5/0.1M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 5	50mM HEPES	pH7.5/0.1M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Triton X-100
実施例 6	50mM HEPES	pH7.5/0.1M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% NP-40
実施例 7	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/0.5(v/v)% Tween 20
実施例 8	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/2(v/v)% Tween 20
実施例 9	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/3(v/v)% Tween 20
実施例 10	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/5(v/v)% Tween 20
実施例 11	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/10(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20
実施例 12	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/5.0(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20
実施例 13	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20
実施例 14	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20
実施例 15	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PEG3350/1(v/v)% Tween 20
実施例 16	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/10.0(w/v)%PEG200/1(v/v)% Tween 20
実施例 17	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 18	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PPG2000/1(v/v)% Tween 20
実施例 19	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/5.0(w/v)%PPG400/1(v/v)% Tween 20
実施例 20	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/1.0-5.0%Ficoll70/1(v/v)% Tween 20
実施例 21	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.1% β -cyclodextrin/1(v/v)% Tween 20
実施例 22	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 23	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 24	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 25	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 26	50mM HEPES	pH7.5/0.1M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 27	50mM HEPES	pH7.5/0.1M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 28	50mM HEPES	pH7.5/0.1M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 29	50mM HEPES	pH7.5/0.1M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 30	50mM HEPES	pH7.5/0.5M NaCl/20mM	2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/2(v/v)% Tween 20

[0091] [表12]

[illegible]

[0092] [表13]

機能賦活剤		タンパク質	活性(リフォールディング率):タンパク質 回収率	備考
比較例 1	ゼオライト K-LTL	RPA70(黄色シロコジヨウハエ由来)	DNA結合活性無	Na-LSX:低シリカゼオライトX
比較例 2	ゼオライト H-Y	同上	DNA結合活性無	
比較例 3	ゼオライト H-USY330	同上	DNA結合活性無	
比較例 4	ゼオライト H-USY360	同上	DNA結合活性無	
比較例 5	ゼオライト K-FER	同上	DNA結合活性無	
比較例 7	Na-LSX	同上	DNA結合活性無	HOM:メソポーラスシリケートの1種
比較例 8	RUB-15	同上	DNA結合活性無	
比較例 9	Na-FAU	同上	DNA結合活性無	
比較例 10	カネマイト⑨	同上	DNA結合活性無	
比較例 11	HOM(pore 7nm)	同上	DNA結合活性無	
比較例 12	HOM(pore 5nm)	同上	DNA結合活性無	PLS:層状シリケートの1種
比較例 13	HOM(pore 6nm)	同上	DNA結合活性無	
比較例 14	PLS	同上	DNA結合活性無	
比較例 15	MCM-22	同上	DNA結合活性無	
比較例 16	FER-TEA	同上	DNA結合活性無	
比較例 17	MOR-TEA	同上	DNA結合活性無	
比較例 18	FER-ピリジン	同上	DNA結合活性無	
比較例 19	ゼオライトベータ構造未形成シリカ(BEA 135°C, 24h)J	同上	DNA結合活性無	
比較例 20	ゼオライトベータ構造未形成GaBEA	同上	DNA結合活性無	
比較例 21	ZSM-5(MFI-TPA)	同上	DNA結合活性無	
比較例 22	シリカライト(MFI-TPA)	同上	DNA結合活性無	
比較例 23	比較例22のH型に更にTPAを含ま	同上	DNA結合活性痕跡(0.1%以下)	
比較例 24	AlPO ₄ -5(アミン:トリエチル)	同上	DNA結合活性痕跡(0.1%以下)	
比較例 25	AlPO ₄ -5(比較例23の)焼成品	同上	DNA結合活性無	
比較例 26	CoAlPO ₄ -5未焼成品	同上	DNA結合活性無	
比較例 27	比較例26の焼成品	同上	DNA結合活性無	
比較例 28	SnAlPO ₄ -5	同上	DNA結合活性痕跡(0.1%以下)	
比較例 29	比較例28の焼成品	同上	DNA結合活性無	

[0093] [表14]

		リフォルディングバッファー	
		50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォルディング因子/非イオン系界面活性剤	
比較例	1	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	2	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	3	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	4	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	5	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	7	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	8	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	9	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	10	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	11	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	12	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	13	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	14	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	15	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/2(v/v)% Tween 20	
比較例	16	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	17	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	18	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	19	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	20	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	21	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	22	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	23	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	24	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	25	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	26	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	27	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	28	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
比較例	29	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	

[0094] 本発明の第4の態様の実施例及び比較例

以下、本実施例では、大腸菌発現系生産タンパク質及び変性タンパク質の機能賦活を説明するが、本発明は、これら実施例に限定・制限されるものではない。

1) 試料等の調製

(a) リフォルディング成形体

非晶質シリカ・アルミナの成形体及び無機・セラミックス系支持体表面に塗布した非晶質シリカ・アルミナ被膜をドライコンバージョン法及び固相変換法でゼオライトベータとする方法、濾紙や無機・セラミックス系支持体表面にその場合成法でゼオライトベータを堆積固定化する方法、支持体表面に接着剤でゼオライトベータを固定化する方法、接着テープなど接着面を利用したのゼオライトベータの固定化法などで、リフォルディング成形体を作製した。接着剤及び接着面を利用する後二者においては、予め自前で合成しておいたゼオライトベータ、又は市販品、及びそれらをイオン交換等修飾処理した各種ゼオライトベータを用いて、成形体の作製を行った。

[0095] (b) 変性タンパク質溶液

活性賦活対象タンパク質として、RPA70(黄色ショウジョウバエ由来)、P53(ヒト由来)等を使用した。

[0096] (c)リフォールディングバッファー

一般には、リフォールディングバッファーとして、50mM HEPES pH7.5 / 0.5M NaCl / 20mM 2-メルカプトエタノール / 0.5(w/v)% ポリエチレングリコール 20000(リフォールディング因子) / 1(v/v)% Tween20(界面活性剤)の組成の液を用いた。

[0097] 2)活性測定操作

活性測定には、用いたタンパク質の働きに応じた方法を採用した。具体的には、以下に述べる4種の測定、すなわちゲルシフトアッセイ、ポリメラーゼアッセイ、リゾチーム活性測定及びトポイソメラーゼI 活性測定で行った。

[0098] (a)ゲルシフトアッセイ

1pmol の放射性同位体で標識したオリゴヌクレオチドDNA とリフォールディングしたタンパク質を、組成25mM HEPES pH7.4・50mM KCl・20% glycerol・0.1% NP-40・1mM DTT・1mg/ml bovine serum albumin の溶液中で、氷上30分インキュベートし、4.5%のポリアクリルアミノゲルで0.5 × TBE のバッファーを使い、4℃で電気泳動した。

[0099] タンパク質にDNA 結合性がある(すなわち活性がある)場合、DNA にタンパク質が結合し、これにより、電気泳動が遅くなりバンドがシフトするので、これにより、活性(すなわちリフォールディング率)を判定した。

[0100] (b)ポリメラーゼアッセイ

鋳型DNA として、poly(dA)oligo(dT)12-18あるいはDNase I-activate calf thymus DNAを使用し、反応液には組成(終濃度)50mM TrisHCl pH7.5・1mM DTT・15% glycerol・5mM MgCl₂・0.5 μM dTTP (cold) (チミジル酸三リン酸)・[3H]-dTTP (5mCi/ml: 100-500cpm/pmol)のものをを用いた。まず、この反応液の濃度が2倍のもの10 μl にタンパク質(酵素)サンプル溶液を加え、懸濁した後、37℃で1時間インキュベートした後、氷上に置き反応を停止させた。

[0101] その後、正方形に切ったDE81紙に反応液を滴下し、乾燥させた後、ビーカーの中に移して、未反応dTTPを溶解除去するために洗浄した。洗浄は、まず5%リン酸水素

二ナトリウム水溶液で3回行い、次いで蒸留水で3回、更に、エタノールで2回行い、その後、乾燥した。このようにして得た乾燥DE81紙をシンチレーターが入ったバイアルに入れ、シンチレーションカウンターで放射活性(cpm)を測定した。酵素サンプルの活性が強いほど、それで合成されるDNA に放射性同位体で標識したdTTPがより多く取り込まれ放射性が高くなるので、これによりタンパク質の活性を判定した。

[0102] (c) リゾチームの活性測定

基質に細菌 *M. lysodeikticus* を選び、これを50mMリン酸バッファーで懸濁し、0.16mg/ml 濃度の基質溶液を調製した。この基質溶液480 μ l に20 μ l のタンパク質(酵素リゾチーム)溶液を加え、室温で30分間インキュベートした。その後、波長450nm の吸光度を測定した。リゾチームは、細菌の細胞壁を分解する能力があるので、その能力、すなわち活性が高いほど吸光度は減少する。リゾチーム活性1 unitは1分間あたりに450nm の吸光度が0.001 減少することと定義した。

[0103] (d) トポイソメラーゼI 活性測定

0.5 μ g のsupercoiled pBR322 とトポイソメラーゼ (Topoisomerase)I タンパク質を反応バッファー(10mM TrisHCl, pH7.5, 150mM NaCl, 5mM β -mercaptoethanol, 0.5mM EDTA)に懸濁し、37°Cで30分インキュベーションした後、0.1%SDS を添加し反応を停止した。次に、これに0.5 μ g/ml proeinase Kを添加し、37°Cで30分インキュベーションし、液中のタンパク質トポイソメラーゼI を分解した。この後、この液を1%(w/v) アガロースで電気泳動し、0.5 μ g/mlのエチジウムブロマイドでDNA染色し、UVトランスイルミネーターで上方にシフトしたDNAのバンドを確認することによってトポイソメラーゼI 活性測定を行った。

[0104] (リフォールディング操作例1)

市販の接着テープ(セロテープ(登録商標))の接着面にゼオライトベータ粉末を敷き詰め固定化した膜に、前記の変性タンパク質(RPA70)溶液(濃度は0.5 ~ 1.0mg/ml)を0.5ml を滴下し、膜表面を溶液に浸した。該タンパク質のリフォールディング成形体上への吸着を確実にするために、しばらく放置した後、タンパク質変性剤を完全に除去するために、溶液を切り、膜表面を蒸留水で4回洗った。

[0105] その後、リフォールディング成形体上に、1ml のリフォールディングバッファー(

50mM HEPES pH7.5、0.5MNaCl、20mM 2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子及び非イオン系界面活性剤から構成)を滴下し、リフォールディング成形体上に吸着した該タンパク質を脱着・溶離させた。リフォールディング成形体を引き上げて、残った溶液を新しいエッペンドルフチューブに移し、上述のゲルシフトアッセイで活性測定を行ったところ、活性を示し、RPA70がリフォールディングしたことが確かめられた。

[0106] (リフォールディング操作例2)

市販の両面接着テープを用いて、両面ゼオライトベータ成形膜を作製し、用いた以外は、前記操作例1と全く同様な手順・操作で変性RPA70タンパク質のリフォールディングを行った。ゲルシフトアッセイで活性が認められ、リフォールディングが起こったことが確かめられた。

[0107] (リフォールディング操作例3)

市販の多孔質 α -アルミナチューブ(円筒形、長さ5cm、口径5mm)の表面を、その場合合成法でゼオライトベータ被覆した成形体を用いた以外は、前記操作例1と全く同様な手順・操作で変性RPA70タンパク質のリフォールディングを行った。ゲルシフトアッセイで活性が認められ、リフォールディングが起こったことが確かめられた。

[0108] (リフォールディング操作比較例1)

リフォールディング操作例1〜3で用いたRPA70変性タンパク質のリフォールディングを、微粉体のゼオライトベータを用いて行った。以下に、その操作を示した。本発明のリフォールディング成形体使用に比べ、遠心分離操作を3回も行い、その都度上澄み液除去、洗浄を繰り返す必要があり、ゼオライトベータ微粉体による操作は極めて煩雑であった。

[0109] 1.5mlのエッペンドルフチューブに100mgのゼオライトベータ微粉体を入れ、0.5mlの6M塩酸グアニジン・20mMトリスアミノメタン三塩酸塩(TrisHCl)pH7.5・0.5M NaCl・20mM 2-メルカプトエタノールを加えて懸濁した。これに、6M塩酸グアニジン・20mM 2-メルカプトエタノールを加え、氷上で1時間放置し、変性したRPA70タンパク質溶液(濃度は0.5〜1.0mg/ml)を0.5ml加えた。この混合液を、該タンパク質のゼオライトベータ微粉体上への吸着を確実にするために、低温室に置かれたROTARY

CUTURE RCC-100 (IWAKI GLASS 社製) で、1時間攪拌した。

[0110] その後、10000×g で5秒間遠心して、ゼオライトベータ微粉体を沈殿させ、上澄みを除去した。次に、この沈殿したゼオライトベータ微粉体からタンパク質変性剤を完全に除去するために、これを1ml の20mM TrisHCl pH7.5・20mM 2-メルカプトエタノール(又は水)で4回洗った後、10000 ×g で5秒間遠心し、更に、生じた上澄みを捨てた。残ったゼオライトベータ微粉体に、1ml のリフォールディングバッファー (50mM HEPES pH7.5、0.5M NaCl 、20mM2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子及び非イオン系界面活性剤から構成)を加え、懸濁した。

[0111] ゼオライトベータ微粉体上に吸着した該タンパク質を脱着・溶離させるために、この懸濁液を再び低温下のROTARY CUTURE RCC-100 (IWAKI GLASS 社製)で攪拌した。その後、10000 ×g で5秒間遠心して、ゼオライトベータ微粉体を沈殿させ、該タンパク質を含む上澄みを新しいエッペンドルフチューブに移し、ゲルシフトアッセイによる活性測定に用いた。活性が認められ、RPA70のリフォールディングが確認された。

[0112] 上記実施例に示されるように、リフォールディング成形体の使用により、DNA結合活性等のタンパク質本来の活性が、極めて簡単な操作で迅速に得られることが分かった。本発明のリフォールディング成形体は、種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用できる、一般性、普遍性の高いリフォールディング成形体として有用であり、その適用は、実施例に示されたタンパク質に限定されるものではなく、任意のタンパク質に適用し得るものである。

産業上の利用可能性

[0113] 以上詳述したように、本発明は、不活性タンパク質の機能賦活方法等に係るものであり、本発明によって、大腸菌等の発現系で産生された高次構造が未形成なために不活性なタンパク質、あるいはある種の原因で立体構造が変化して失活したタンパク質の本来の機能・活性をリフォールディングにより賦活させることができる。この方法は、インクルージョンボディを効率よくリフォールディングする方法として有用である。種々のタンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかもリフォールディング率の高い効率的な方法を提供できる。本発明で用いる機能賦活剤のゼオライトベータは

、低コストであり、しかも、繰り返し使用可能である。この方法は、分子量10万を超える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォールディングに適用できる。例えば、大腸菌の発現系によるタンパク質合成プロセスと本発明の方法を組み合わせることにより、高次構造の制御されて該タンパク質固有の本来機能が発揮されるタンパク質を生産する新しい活性タンパク質の製造プロセスを構築することができる。

[0114] また、本発明によって、種々のタンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかも、リフォールディング率の高い、効率的なリフォールディングキットと、その使用方法を提供できる。本発明のキットの、必須成分であるリフォールディング剤を構成するゼオライトベータは、低コストであり、しかも、繰り返し使用が可能である。このリフォールディングキットは、分子量10万を越える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォールディングに効力を有する。したがって、更なる展開、例えば、大腸菌の発現系によるタンパク質合成プロセスと、本発明のキット並びにその使用法とを組み合わせることにより、高次構造の制御された該タンパク質固有の本来機能が備わったタンパク質を生産する、新規の活性タンパク質製造プロセス・システムを構築することができる。

[0115] 更に、本発明は、不活性タンパク質の機能賦活剤及び成形体に係わるものであり、本発明の機能賦活剤を用いた方法は、インクルージョンボディを効率よくリフォールディングする方法として有用である。種々のタンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかもリフォールディング率の高い効率的なリフォールディング剤を提供できる。本発明のリフォールディング剤を構成するゼオライトベータは、低コストであり、しかも、繰り返し使用が可能である。本発明のリフォールディング剤は、分子量10万を越える大型のタンパク質を含む、種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォールディングに効力を有する。したがって、更なる展開、例えば、大腸菌の発現系によるタンパク質合成プロセスと、本発明のリフォールディング剤並びにその使用法とを組み合わせることにより、高次構造の制御された該タンパク質固有の本来機能が備わったタンパク質を生産する新規の活性タンパク質製造プロセス・システムを構築することができる。

図面の簡単な説明

- [0116] [図1]電気泳動によるゲルシフトアッセイの結果を示す。
[図2]リフォールディングされたタンパク質の回収率、及び活性の回復率を示す。
[図3]電気泳動によるゲルシフトアッセイの結果を示す。

請求の範囲

- [1] 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質の機能を賦活する方法であって、該タンパク質をゼオライトベータに接触させることにより、該タンパク質固有の本来機能を発現させ得る状態にすることを特徴とするタンパク質の機能賦活方法。
- [2] 該タンパク質を、タンパク質変性剤、界面活性剤及び／又はリフォールディングバッファーの存在下で、ゼオライトベータと接触させる、請求項1に記載の方法。
- [3] 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、大腸菌の発現系で産生されたタンパク質である、請求項1に記載の方法。
- [4] 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、熱履歴の原因で失活したタンパク質である、請求項1に記載の方法。
- [5] ゼオライトベータを含む溶液との混合、又はゼオライトベータ充填カラムへの注入により、タンパク質をゼオライトベータに吸着させ、次いで脱着させる、請求項1に記載の方法。
- [6] 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォールディングすることを特徴とするタンパク質の主体構造の改変方法。
- [7] 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォールディングすることにより、高次構造が制御されて該タンパク質固有の本来機能が賦活されたタンパク質を製造することを特徴とする活性タンパク質の製造方法。
- [8] 目的のタンパク質の合成を担う遺伝子コードを組み込んだ大腸菌により産生された不活性タンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォールディングする、請求項7に記載のタンパク質の製造方法。
- [9] 高次構造が無秩序なため、不活性であるタンパク質の高次構造を整え、活性にする、タンパク質の機能賦活(リフォールディング)操作・工程で用いる試剤キットであって、BEA構造のゼオライト(ゼオライトベータ)からなるリフォールディング剤を構成要件として含むことを特徴とするタンパク質リフォールディングキット。
- [10] キットが、上記ゼオライトベータからなるリフォールディング剤、タンパク質変性剤及

びpH調整剤を基本構成成分とし、更に、タンパク質S-S架橋形成防止剤、界面活性剤及びリフォールディング因子のうちの1種又は2種以上を含む組み合わせから構成されることを特徴とする請求項9記載のリフォールディングキット。

- [11] ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素、酸素及びそれ以外の1種又は2種以上の元素を含むことを特徴とする請求項9又は10に記載のリフォールディングキット。
- [12] ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素と酸素、又はケイ素とアルミニウムと酸素のみからなることを特徴とする請求項9から11のいずれかに記載のリフォールディングキット。
- [13] ゼオライトベータが、アンモニウム類を含むことを特徴とする請求項9から12のいずれかに記載のリフォールディングキット。
- [14] アンモニウム類が、アンモニウムイオン、有機アミン及び／又は酸アミドであることを特徴とする請求項13に記載のリフォールディングキット。
- [15] 有機アミンが、テトラアルキルアンモニウムであることを特徴とする請求項14に記載のリフォールディングキット。
- [16] キット中のタンパク質変性剤が、塩酸グアニジンであることを特徴とする請求項10から15のいずれかに記載のリフォールディングキット。
- [17] キット中のpH調整剤が、トリスアミノメタン三塩酸塩(TrisHCl)及び／又は4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸(HEPES)であることを特徴とする請求項10から16のいずれかに記載のリフォールディングキット。
- [18] キット中のタンパク質S-S架橋形成防止剤が、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、シスチン又はチオフェノールであることを特徴とする請求項10から17のいずれかに記載のリフォールディングキット。
- [19] キット中の、界面活性剤及びリフォールディング因子が、ポリエチレングリコール、Ficol170、Ficol1400、ポリ燐酸、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、スクロース、グルコース、グリセロール、イノシトール、シクロデキストリン、アミロース、Dextran T-500、Tween20、Tween40、Tween60、NP-40、SB3-14、SB12、CTAB及びTritonX-100のうちの1種又は2種以上から選ばれることを特徴とする請求項10から18のいずれかに記載のリフォールディングキット。

- [20] キットが、HEPES、ハロゲン化アルカリ、2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子及び界面活性剤から構成される溶液(リフォールディングバッファー)、上記リフォールディング剤、塩酸グアニジン、TrisHCl及び2-メルカプトエタノールからなるキットであるか、又は、該リフォールディングバッファー、該リフォールディング剤、塩酸グアニジン、TrisHCl、2-メルカプトエタノール及びハロゲン化アルカリからなるキットであることを特徴とする請求項9から15のいずれかに記載のリフォールディングキット。
- [21] 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質の、高次構造を整え、活性にするタンパク質巻き戻し機能を有するリフォールディング剤であって、BEA構造のゼオライト(ゼオライトベータ)からなることを特徴とするタンパク質リフォールディング剤。
- [22] タンパク質変性剤、界面活性剤及び／又はリフォールディングバッファーの存在下で、タンパク質の巻き戻しが行われる、請求項21に記載のリフォールディング剤。
- [23] 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、大腸菌の発現系で生産されたタンパク質であることを特徴とする、請求項21に記載のリフォールディング剤。
- [24] 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、熱履歴の原因で失活したタンパク質であることを特徴とする、請求項21に記載のリフォールディング剤。
- [25] ゼオライトベータが、アンモニウムイオン、有機アンモニウムイオン及び／又は尿素を含むことを特徴とする、請求項21に記載のリフォールディング剤。
- [26] 有機アンモニウムイオンが、モノ、ジ、トリ及び／又はテトラアルキルアンモニウムイオン(アルキル基は、メチル、エチル、プロピル又はブチル)であることを特徴とする、請求項25に記載のリフォールディング剤。
- [27] ゼオライトベータの骨格構造が、酸素とそれ以外の1種又は2種以上の元素からなることを特徴とする、請求項21に記載のリフォールディング剤。
- [28] ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素及び酸素、又はケイ素、アルミニウム及び酸素からなることを特徴とする、請求項27に記載のリフォールディング剤。
- [29] 溶液中に分散したタンパク質と接触することにより、タンパク質巻き戻し機能を発揮する、請求項21から28のいずれかに記載のリフォールディング剤。
- [30] 溶液中の前記タンパク質を、該リフォールディング剤との混合、又は該リフォールデ

イング剤充填カラムへの注入により、吸着させ、しかる後、脱着させる操作で該タンパク質の巻き戻しを起こさせる、請求項21から29のいずれかに記載のリフォールディング剤。

- [31] 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質の高次構造を整え活性にする、いわゆる巻き戻し機能を有するBEA構造のゼオライト(通称、ゼオライトベータ)を含む成形体で構成されることを特徴とするリフォールディング成形体。
- [32] 成形体が、ゼオライトベータ、又はゼオライトベータとそれを支持する基材からなることを特徴とする、請求項31に記載のリフォールディング成形体。
- [33] タンパク質と接触することにより、巻き戻し機能を発揮する請求項31に記載のリフォールディング成形体。
- [34] タンパク質変性剤、界面活性剤及び／又はリフォールディングバッファの存在下で、タンパク質の巻き戻しが行われる、請求項31に記載のリフォールディング成形体。
- [35] 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、大腸菌の発現系で生産されたタンパク質であることを特徴とする、請求項31に記載のリフォールディング成形体。
- [36] 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、熱履歴の原因で失活したタンパク質であることを特徴とする、請求項31に記載のリフォールディング成形体。
- [37] ゼオライトベータが、アンモニウムイオン及び／又は有機アンモニウムイオンを含むことを特徴とする、請求項31に記載のリフォールディング成形体。
- [38] 有機アンモニウムが、モノ、ジ、トリ及び／又はテトラアルキルアンモニウム(アルキル基は、メチル、エチル、プロピル、ブチル)イオンであることを特徴とする、請求項37に記載のリフォールディング成形体。
- [39] ゼオライトベータの骨格構造が、酸素とそれ以外の1種又は2種以上の元素からなることを特徴とする、請求項31に記載のリフォールディング成形体。
- [40] ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素及び酸素、又はケイ素、アルミニウム及び酸素からなることを特徴とする、請求項39に記載のリフォールディング成形体。
- [41] 溶液中に分散したタンパク質と接触することによって、タンパク質巻き戻し機能を発揮する、請求項31から40のいずれかに記載のリフォールディング成形体。

- [42] 溶液中の前記タンパク質を、該リフォールディング成形体と混合、又は該成形体上に流す、又は滴下することにより、該タンパク質を該成形体に吸着させ、しかる後、脱着させる操作で該タンパク質の巻き戻しを起こさせる機能を有する、請求項31から41のいずれかに記載のリフォールディング成形体。

[図1]

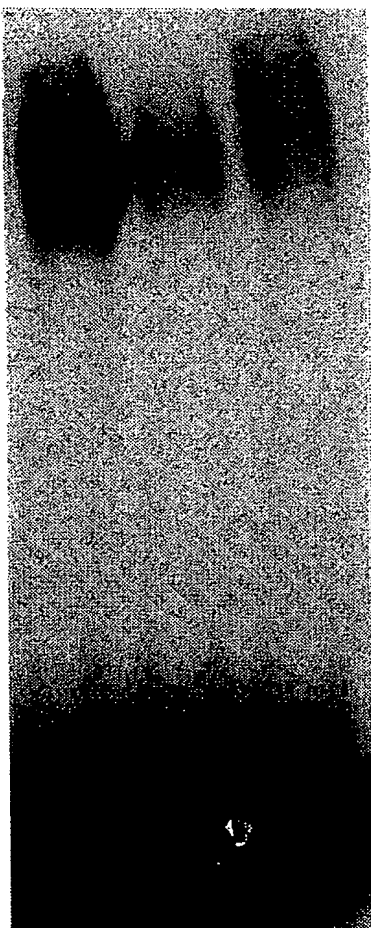
(レーン : 1(v/v)%非イオン系界面活性剤)

1 : Tween20

2 : Triton X-100

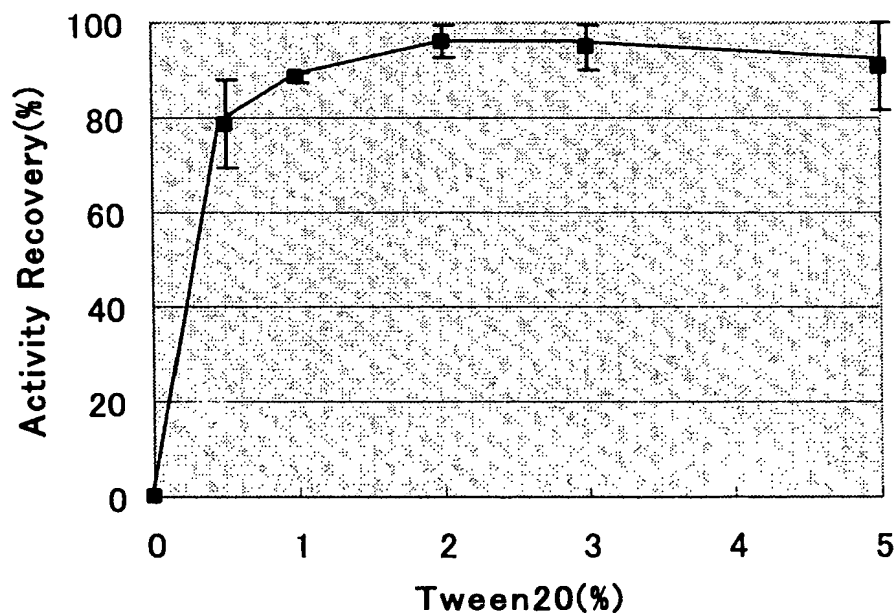
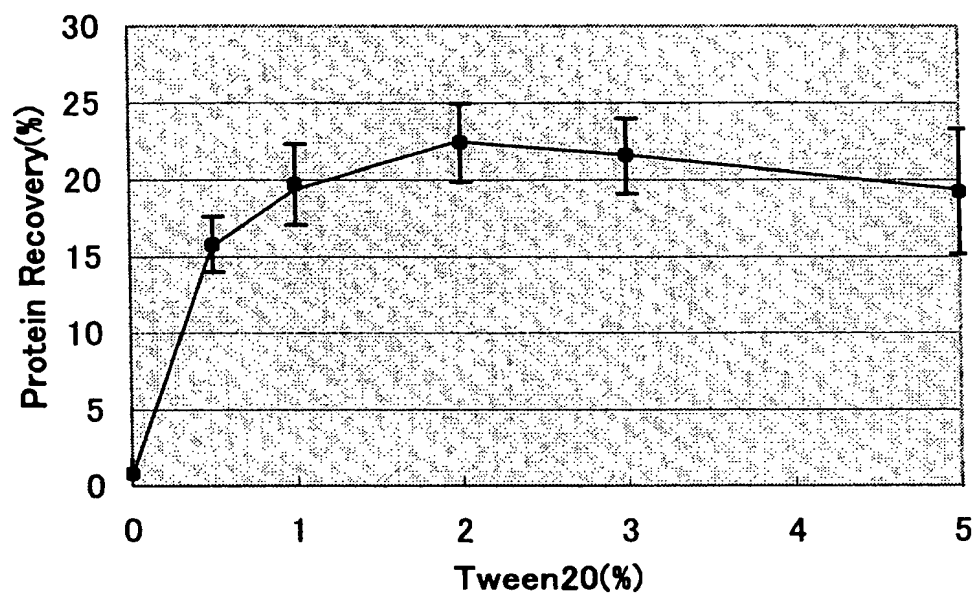
3 : NP-40

1 2 3



Best Available Copy

[図2]



* エラーバーは標準偏差

[図3]

(レーン：リフォールディング因子)

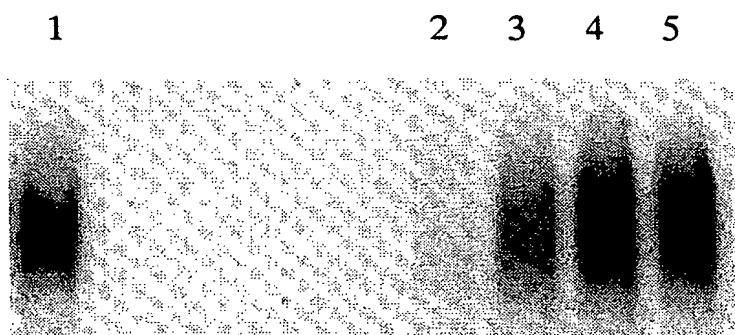
1 : なし

2 : 10(w/v)% polyethylene glycol 8,000

3 : 5.0(w/v)% polyethylene glycol 8,000

4 : 1.0(w/v)% polyethylene glycol 8,000

5 : 0.5(w/v)% polyethylene glycol 8,000



(シフトしていないバンドは除去した)

Best Available Copy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009664

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K1/113

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K1/113

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94/00213 A1 (Tektolit AB.), 06 January, 1994 (06.01.94), Abstract & AU 4519793 A	1-42
A	MATSUI, M. et al., "Selective Adsorption of Biopolymers on Zeolites", Chem.Eur.J., (2001), Vol.7, pages 1555 to 1560, abstract	1-42
A	Blum, Z. et al., "Removal of triton X-100 and SDS from protein solutions with zeolite Y", Acta.Chem.Scand., (1990), Vol.44, No.5, pages 531 to 532, abstract	1-42

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 September, 2004 (16.09.04)Date of mailing of the international search report
19 October, 2004 (19.10.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C07K1/113

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C07K1/113

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 94/00213 A1 (Tektolit AB), 1994.01.06, 要約参照 & AU 4519793 A	1-42
A	Matsui, M. et al., "Selective Adsorption of Biopolymers on Zeolites" Chem. Eur. J., (2001), Vol.7, pp.1555-1560, 要約 参照	1-42
A	Blum, Z. et al., "Removal of triton X-100 and SDS from protein solutions with zeolite Y" Acta Chem. Scand., (1990), Vol.44, No.5, pp.531-532, 要約参照	1-42

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.09.2004

国際調査報告の発送日

19.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊

4B

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448